

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali

**Dottorato in Scienze Veterinarie
XXXVI Ciclo**

**Tesi in:
Clinica Medica Veterinaria**

**Titolo:
INDAGINE PROTEOMICA SU SIERO DI CAVALLI
AFFETTI DA COLICA DA COSTIPAZIONE**

**Tutor:
Chiar.mo Prof.
Paolo Ciaramella**

**Candidata:
Dott.ssa
Maria Chiara Alterisio**

Anno accademico: 2022-2023

OVUD

Ospedale Veterinario Universitario Didattico



INDICE

Pagine

SINOSSI	7
ABSTRACT	8
INTRODUZIONE	9
Bibliografia	13

Parte Generale

1	NOZIONI DI ANATOMIA E FISIOLOGIA APPLICATA DELL'APPARATO GASTRO-ENTERICO	14
	1.1 Tratto Gastro Enterico Anteriore	15
	1.2 Cavo orale	15
	1.3 Faringe ed esofago	16
	1.4 Stomaco	17
	1.5 Piccolo Intestino	19
	1.6 Grosso Intestino	20
	1.7 Altri punti chiave	25
	1.8 Bibliografia	29
2	EPIDEMIOLOGIA DELLE COLICHE NEL CAVALLO	30
	2.1 Introduzione	30
	2.2 Studi Sulla Popolazione E "Big Data"	30
	2.3 Costi ed Accessibilità Delle Cure	33
	2.4 L'elemento Umano	34
	2.5 Prevenzione delle coliche	36
	2.6 Stalla, affluenza al pascolo ed esercizio fisico	37
	2.7 Dieta	39
	2.8 Profilassi delle parassitosi	40
	2.9 Profilassi Dentale	41
	2.10 Comportamento Stereotipato	41
	2.11 Processo Decisionale Riguardante la Probabile Diagnosi e il Trattamento	42
	2.12 Bibliografia	46
3	ESEMPI DI COLICHE A CARATTERE INTERNISTICO	52
	3.1 Costipazione Gastrica	52
	3.2 Malattia Ghiandolare Gastrica Equina	56
	3.3 Malattia Infiammatoria Intestinale	63
	3.4 Dislocazione del Colon	68
	3.5 Bibliografia	70
3	COLICHE DA COSTIPAZIONE	80
	3.1 Costipazione Duodenale e Digiunale	83
	3.2 Costipazione Ileale	83
	3.3 Costipazione del Cieco	86
	3.4 Costipazione del Colon Ascendente (Grosso Colon).	90
	3.5 Costipazione Del Colon Discendente (Piccolo Colon)	93
	3.5 Bibliografia	96
4	RISPOSTA INFIAMMATORIA NEI CAVALLI CON COLICHE	98
	4.1 Sindrome Da Risposta Infiammatoria Sistemica (SIRS)	98

4.2 Il Sistema Immunitario Innato	99
4.3 Recettori Per Il Riconoscimento del Modello e loro Ruolo nella SIRS Equina	100
4.4 TLR4 e le sue interazioni con LPS	101
4.5 Il Percorso del Segnale Attivato dal TLR4	102
4.6 Altri TLRs equini e loro PAMP	105
4.7 Mediatori Rilasciati Tramite l'attivazione Dei TLR e loro Effetti Fisiologici	107
4.8 Differenze nella Risposta delle Cellule Equine All'attivazione dei TLR	107
4.9 Il Focus sull'endotossemia	110
4.10 Rilevamento dei LPS	113
4.11 SIRS o endotossemia?	113
4.12 Trattamento	114
4.13 Bibliografia	116
5 LA PROTEOMICA	119
5.1 La Proteomica in Medicina Ippiatrica	124
5.2 Bibliografia	129

Parte Sperimentale

6 MATERIALI E METODI	131
7 RISULTATI	137
8 DISCUSSIONE	149
9 CONCLUSIONI	161
Bibliografia	162
Ringraziamenti	XX

Figure

Figura 1. Tratto gastrointestinale del cavallo.	15
Figura 2. Illustrazione che mostra come la peristalsi, o contrazioni muscolari, nell'esofago spinge un bolo alimentare verso lo stomaco del cavallo.	17
Figura 3. Le regioni ghiandolari e non ghiandolari dello stomaco di un cavallo.	17
Figura 4. Visualizzato un segmento dell'intestino tenue con il mesentero che collega l'intestino all'addome.	19
Figura 5. Il cieco di un cavallo.	23
Figura 6. Rappresentazione del pacchetto intestinale equino che permette la visione della flessura pelvica (freccia blu).	25
Figura 7. Un cavallo in una stalla	27
Figura 8. Andamenti stagionali delle coliche nei casi presentati a un ospedale di riferimento	38
Figura 9. Aspetto endoscopico di una discreta concrezione di ingesta ricoperta di muco in un cavallo con vaghi segni di anoressia e ridotta prestazione sportiva.	56
Figura 10. Aspetto endoscopico di un'occlusione gastrica estesa al cardias in un asino (a sinistra) e in un cavallo	56
Figura 11. Due aspetti comuni, ma molto diversi, di lesioni ghiandolari gastriche.	60

Figura 12. Alcune lesioni multifocali in rilievo che circondano il piloro in un cavallo incrociato da tiro irlandese di 12 anni che presentava coliche ricorrenti e ostruzioni gastriche intermittenti.	62
Figura 13. Quattro immagini ecografiche ottenute da cavalli con diagnosi di MII, utilizzando biopsie.	66
Figura 14. Ecografia transaddominale del 12° spazio intercostale destro di un cavallo con DDDGC.	71
Figura 15. Trocarizzazione di un cieco disteso dai gas.	74
Figura 16. Segnalazione intracellulare distale al recettore toll-like 4.	104

Tabelle

Tabella 1. Percentuali di volume gastrointestinale per diverse specie	15
Tabella 2. pH del dell'alimento digerito in tutto il tratto digestivo equino	19
Tabella 3. Proporzione approssimativa di macronutrienti digeriti e assorbiti	20
Tabella 4. Assunzioni massime per pasto di mangimi comuni e cereali somministrati ai cavalli	28
Tabella 5. Fattori di rischio a livello di cavallo e di gestione per forme specifiche di coliche identificati da studi epidemiologici	44
Tabella 6. Riepilogo delle caratteristiche cliniche (segnalamento e principali segni clinici) osservati in cavalli affetti da colica da costipazione (n=7) al momento del ricovero	138
Tabella 7. Cambiamenti di espressione statisticamente significativi delle proteine nel siero di cavalli affetti colica da costipazione (n=7) nel confronto pretrattamento (fase acuta - ricovero) vs. gruppo di controllo (animali sani) (n=3).	139
Tabella 8. Cambiamenti di espressione statisticamente significativi delle proteine nel siero di cavalli affetti colica da costipazione (n=7) nel confronto post-trattamento conservativo (guarigione – dimissioni) vs. pretrattamento (fase acuta - ricovero)	142

Grafici

Grafico 1. Volcano plot che mostra proteine diversamente espresse nel siero di cavalli affetti colica da costipazione (n=7) nel confronto pretrattamento (fase acuta - ricovero) vs. gruppo di controllo (animali sani) (n=3). Le proteine significativamente, positivamente regolate (<i>up-regulated</i>), sono rappresentate con i punti rossi, quelle significativamente, negativamente regolate (<i>down-regulated</i>), sono rappresentate con i punti viola.	141
Grafico 2. Volcano plot che mostra proteine diversamente espresse nel siero di cavalli affetti da colica da costipazione (n=7) nel confronto post-trattamento conservativo (guarigione – dimissioni) vs. pretrattamento (fase acuta - ricovero). Le proteine significativamente, positivamente regolate (<i>up-regulated</i>), sono rappresentate con i punti rossi, quelle	146

	significativamente, negativamente regolate (<i>downregulated</i>), sono rappresentate con i punti viola.	
Grafico 3.	Analisi a componenti principali per le proteine diversamente espresse nel siero di cavalli affetti colica da costipazione (n=7) nel confronto pre-trattamento (fase acuta - ricovero) vs. gruppo di controllo (animali sani) (n=3). In blu sono rappresentati i valori ottenuti negli animali del gruppo controllo, in rosso quelli ottenuti pre-trattamento.	147
Grafico 4.	Analisi a componenti principali per le proteine diversamente espresse nel siero di cavalli affetti colica da costipazione (n=7) nel confronto post-trattamento conservativo (guarigione – dimissioni) vs. pretrattamento (fase acuta - ricovero). In blu sono rappresentati i valori ottenuti negli animali post-trattamento, in rosso quelli ottenuti pre-trattamento.	147
Grafico 5.	Rappresentazione grafica del network proteico derivante dall'analisi funzionale delle molecole utilizzando un <i>layout</i> radiale nei cavalli affetti da colica da costipazione (n=7) nel confronto post-trattamento conservativo (guarigione – dimissioni) vs. pre-trattamento (fase acuta - ricovero). In blu sono rappresentati i geni delle proteine sotto-espresse (<i>down-regulated</i>), in rosso quelli sovraregolati (<i>up-regulated</i>).	148

Riquadri

Riquadro 1.	Criteri per la diagnosi della Sindrome da Risposta Infiammatoria Sistemica	99
Riquadro 2.	Esempi di ligandi per i recettori <i>toll-like</i> negli equini	102

Titolo

INDAGINE PROTEOMICA SU SIERO DI CAVALLI EFFETTI DA COLICA DA COSTIPAZIONE

Premessa ed obiettivo. La salute e il benessere degli equidi rappresenta un ambito importante della Medicina Veterinaria, sebbene, alcune malattie ricorrenti, come le coliche da costipazione, rappresentino ancora una significativa sfida clinico-diagnostica. Diviene quindi essenziale trovare biomarcatori di tali condizioni patologiche che possano migliorare la diagnosi precoce, definirne la severità o valutare l'efficacia di eventuali procedure terapeutiche adottate. In considerazione di quanto espresso, l'obiettivo del presente studio è stato quello di utilizzare una tecnica proteomica, per identificare e caratterizzare delle proteine funzionali espresse in cavalli affetti da colica da costipazione del grosso intestino che aiutino a caratterizzare il processo patologico in atto.

Materiali e metodi. Un totale di n°17 campioni sono stati analizzati mediante tecnica basata sulla *Liquid Chromatography with tandem mass spectrometry* (LC-MS/MS), per identificare e caratterizzare delle proteine funzionali espresse in cavalli affetti da colica. Di questi, n°14 sono stati utilizzati per una comparazione intra-gruppo perché ottenuti da n°7 da cavalli malati campionati prima e dopo terapia conservativa convenzionale che ha portato a guarigione clinica i soggetti (comparazione guarigione vs. fase acuta); mentre n°3, provenivano da altrettanti animali sani, sono stati utilizzati per una comparazione inter-gruppo (fase acuta vs. gruppo sani).

Risultati. Alcune differenze nella manifestazione biomolecolare della risposta immunitaria, coagulazione ematica, attività antiossidante, biosintesi ed omeostati dei lipidi sono state osservate prima e dopo l'applicazione della terapia. Tra animali in fase acuta e quelli sani l'analisi funzionale delle proteine espresse non ha permesso raggruppamenti di arricchimento significativi, sebbene siano state osservate delle differenze legate a delle singole proteine coinvolte nella risposta immunitaria innata e nella coagulazione.

Discussione e Conclusioni. L'analisi proteomica si è rivelata un eccellente strumento per la scoperta di biomarcatori per la valutazione dell'efficacia della terapia attuata, mentre meno incoraggianti sono stati i risultati che valutavano la possibilità di fare diagnosi precoce di questo tipo di colica. Tuttavia, la metodica ha permesso di formulare, nel complesso, ipotesi interessanti riguardanti la contemporanea presenza di un dismicrobismo intestinale associato a stato infiammatorio, danno tissutale e mobilizzazione lipidica nei cavalli affetti da colica da costipazione. Ulteriori studi sono auspicabili sia per confermare le ipotesi su una popolazione campione più ampia, sia per comparare i risultati ottenuti con coliche di altra natura al fine di comprendere la specificità dei potenziali biomarker isolati.

ABSTRACT

Title

PROTEOMIC INVESTIGATION ON SERUM OF HORSES AFFECTED BY CONSTIPATION COLIC

Premise and objective. Equine health and welfare represent an important field of veterinary medicine, although some recurrent diseases, such as impaction colics, still represent a significant clinical-diagnostic challenge. The assessment biomarkers of these pathological conditions that can improve early diagnosis, define their severity, or evaluate the effectiveness of any therapeutic procedures became essential. Considering the premises, the objective of the current study was to identify and characterize functional proteins expressed in horses affected by colic due to constipation of the large intestine by a proteomic technique to characterize the ongoing pathological process.

Materials and methods. A total of n°17 samples were analyzed using a technique based on Liquid Chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), to identify and characterize functional proteins expressed in horses affected by colic. Of these, n°14 were used for an intra-group comparison because it was obtained from n°7 sick horses sampled before and after conventional conservative therapy leading to clinical recovery (comparison of recovery vs. acute phase);. At the same time, n°3 belonged to as many healthy animals and were used for an inter-group comparison (acute phase vs. healthy group).

Results. Differences in the biomolecular manifestation of the immune response, blood coagulation, antioxidant activity, biosynthesis and homeostasis of lipids were observed before and after the application of the therapy. Between animals in the acute phase and healthy ones, the functional analysis of the expressed proteins did not allow significant enrichment groupings, although differences linked to individual proteins involved in the innate immune response and coagulation were observed.

Discussion and Conclusions. Proteomic analysis proved to be an excellent tool for the assessment of biomarkers for evaluating the effectiveness of the implemented therapy, while the results evaluating the possibility of making an early diagnosis of this type of colic were less encouraging. However, overall, the method has allowed us to formulate, interesting hypotheses regarding the simultaneous presence of intestinal dysbiosis associated with an inflammatory state, tissue damage and lipid mobilization in horses affected by impaction colic. Further studies are desirable both to confirm the hypotheses on a larger sample population and to compare the results obtained with other types of colic to understand the specificity of the potential isolated biomarkers.

INTRODUZIONE

Con il termine colica genericamente si intende qualsiasi forma di dolore di origine addominale che possa colpire un cavallo e che sia capace di condizionarne, negativamente ed in vario modo, la sua salute e il benessere. Le malattie che si manifestano attraverso uno stato colico sono tra le cause più comuni di morte prematura degli equidi e per questo rappresentano una emergenza clinica da affrontare con la massima celerità ed efficacia.¹ Tra le cause principali di colica vi sono delle affezioni del tratto gastro-intestinale (GI), sebbene, occasionalmente, queste possano originare da altri organi contenuti nella cavità addominale. Tra i principali fattori predisponenti si possono invece annoverare le caratteristiche anatomiche del tratto GI, alterazioni della fisiologia digestiva (ad esempio, carenze, diete errate, ecc.) e *routine* gestionali scorrette degli animali.²

Le coliche posso quindi essere classificate in: “vere” legate a condizioni patologiche del tratto digestivo e “false” anche dette “pseudo-coliche” che originano da altri organi della cavità addominale. Le prime sono spesso causate da costipazioni, coliti, dislocazioni e distensioni d’organo, perciò caratterizzate da sintomi che possono manifestarsi in modo improvviso generando dolore acuto ed evidenti anomalie comportamentali. Al contrario, le pseudo-coliche, possono derivare per lo più da urolitiasi, patologie epatiche, insufficienza renale, miosite ossificante o rabdomiolisi da sforzo; solitamente queste si caratterizzano per una sintomatologia meno acuta e più progressiva.⁴

La gravità di un processo colico può variare, da lieve a severa, e può manifestarsi con segni clinici che, indipendentemente dall'eziologia, possono includere: anoressia, irrequietezza, sudorazione eccessiva, agitazione, guardarsi il fianco da parte del cavallo, colpire o leccarsi la pancia, rotolarsi nel paddock, calciare o rampare.⁴ Oltre al palese stato di malessere legato alla comparsa di un significativa condizione algica, spesso si possono osservare un aumento della frequenza cardiaca, un aumento della motilità intestinale fino alla comparsa di uno *shock* ipovolemico, nei casi più gravi. Data la natura del problema, all’esame clinico completo vanno spesso associate indagini collaterali (ad esempio, l’ultrasonografia) ed esami emato-biochimici (ad esempio, lattati, emocromo ecc.) che possano quantificare la severità del problema, il grado di

infiammazione ad esso legato, nonché svelare particolari danni d'organo e l'eventuale rischio di endotossiemia.

Sebbene il ricorso ad indagini di tipo analitico sia considerato fondamentale per una corretta diagnosi e gestione clinica del paziente, ad oggi la medicina ippiatrica soffre di un *deficit* legato all'assenza di *test* che permettano una diagnosi accurata, specifica, ed in grado di classificare celermente la natura della colica.⁴⁻⁷

Tra cause di colica più ricorrenti sono sicuramente da annoverare quelle da costipazione, per lo più associate ad accumulo di alimento in alcune porzioni del tratto digestivo. Il loro esordio clinico è solitamente lento e, se non accompagnato da complicazioni, raramente genera effetti tali da giustificare un trattamento di natura chirurgica. I frequenti cambi di diametro del tratto GI degli equini e la presenza di sfinteri, a loro volta associati a banali errori alimentari (ad esempio, pasti troppo grandi e poco frequenti, razioni inadeguate, ecc.), sono tra i fattori di rischio che maggiormente possono influire sul determinarsi del quadro clinico. Nonostante le coliche da costipazione siano relativamente frequenti in questa specie, la loro patogenesi non è ancora completamente compresa e la conoscenza/comprensione degli effetti biologici e molecolari è pressoché agli albori.⁸

Se da un lato diagnosticare uno stato colico di un cavallo sia relativamente facile per un Medico Veterinario ippiatra, dall'altro lato, la sua diagnosi eziologica e/o differenziale così come la definizione degli effetti sull'omeostasi corporea diventano una vera sfida clinica.² Ad oggi, si sa con certezza che le coliche possano arrivare a determinare alterazioni emodinamiche legate a lesioni tissutali a loro volta risultanti dall'imponente processo infiammatorio/infettivo che generalmente si instaura.¹ Con la progressione della malattia si possono osservare segni di infiammazione sistemica con conseguente modifica del profilo emato-biochimico. È stato documentato che durante lo stato infiammatorio generatosi in corso di colica, le proteine della fase acuta vengono massivamente rilasciate in circolo e nel fluido peritoneale. Tuttavia, le informazioni disponibili in letteratura circa i mediatori chimici e le biomolecole che si esprimono in corso di sintomatologia acuta sono da considerarsi ancora estremamente frammentarie e aspecifiche, soprattutto se messe in relazione alle capacità di caratterizzare l'eziologia del problema. Henderson e

collaboratori nel 2013, hanno valutato alcune proteine della fase acuta quali marcatori diagnostici in cavalli con coliche di varia natura (ostruzioni, strangolamenti, peritoniti, enterocoliti, rotture d'organo, ecc.) mettendo in evidenza che la Siero Amiloide A migliorava la capacità di differenziare cavalli con colica infiammatoria acuta, che necessitavano di trattamento medico, da quelli con colica che necessitavano di intervento chirurgico. Il parametro migliorava del 4% la possibilità di classificare correttamente condizioni mediche e chirurgiche, rispetto ad altri modelli diagnostici.⁹ Tuttavia, lo studio ha evidenziato alcuni punti critici legati ad un campione non omogeneo per: soggetti arruolati, tipo di patologia e patogenesi, nonché auspicava il ricorso a sistemi di identificazione repentini del tipo di colica in atto così da accelerare la diagnosi e ridurre il rischio di complicazioni. Secondo gli autori, queste limitazioni possono essere superate attraverso (i) ulteriori studi che indaghino gruppi di animali che condividano lo stesso tipo di colica, (ii) l'identificazione di ulteriori biomarcatori specifici per il tipo di problema, (iii) lo sviluppo di test di campo che permettano la valutazione dei singoli parametri sensibili in modo rapido ed economico.⁹

Una parziale risposta al problema potrebbe quindi derivare dalle più avanzate e moderne tecniche diagnostiche “-omiche”. In grado di valutare un gran numero di biomarcatori sia nei tessuti sia nei biofluidi. Alcuni studi hanno utilizzato queste nuove metodologie diagnostiche su diversi substrati¹⁰⁻¹³ con l'obiettivo di identificare nuovi biomarcatori e svelare quali animali possano sviluppare patologie, quali potrebbero guarire mediante terapia conservativa o chirurgica e, in generale, quali possano essere le *chances* di guarigione e sopravvivenza.¹⁰⁻¹² A questo proposito, Tesena e collaboratori nel 2019,¹³ hanno utilizzato un approccio proteomico per studiare biomarker sierici in grado di confermare la diagnosi di ulcera della *pars* ghiandolare dello stomaco equino. Di tutte le proteine considerate, dieci sono state identificate come potenziali marcatori del problema tra cui: la β 1,4 N-acetilgalattosaminil transferasi 2 e Xantina deidrogenasi/ossidasi isoforma X6 entrambe componenti il rivestimento gastrico nei soggetti sani; Cheratina di tipo I citoscheletrica 10 e l'isoforma X2 della callicreina-13, coinvolte nei processi protettivi della mucosa gastrica nei soggetti malati. Nel 2021, invece, Minamijima e collaboratori¹⁴ hanno confrontato i proteomi provenienti da sieri di animali sani e con quelli affetti da

malattie respiratorie associate al trasporto. Le analisi hanno messo in evidenza come quattro proteine, l'apolipoproteina F, la proteina legante i lipopolisaccaridi, il lisozima e la proteina S100-A8 fossero sovra-regolate, mentre la cheratina 1 sotto-regolata nel gruppo malato. L'osservazione di tali variabili sembra essere stata associata allo stimolo infiammatorio generatosi e all'attivazione della risposta immunitaria ed ha permesso, in ultima analisi, di far luce sul meccanismo di sviluppo di tali patologie respiratorie.

Considerando le premesse, l'obiettivo della presente tesi di dottorato è stato quello di eseguire delle indagini di proteomica volte ad (i) identificare e caratterizzare le proteine espresse in corso di colica da costipazione del cavallo; Inoltre, la stessa si pone come obiettivi ulteriori (ii) la comparazione delle proteine espresse prima e dopo terapia risolutiva di tipo conservativo, (iii) nonché il confronto tra quelle rilevate nella fase acuta del processo patologico con quelle che si esprimono in un gruppo controllo di animali sani.

I dati sperimentali saranno preceduti da una parte generale che ripercorre lo stato dell'arte riguardante alcuni aspetti delle coliche del cavallo.

Bibliografia

1. Sarrafchi A, Blokhuis H. J. Equine stereotypic behaviors: Causation, occurrence, and prevention. *J. Vet. Behav.* 2013;8(5):386–394.
2. Cook V.L, Hassel D.M. Evaluation of the colic in horses: Decision for referral. *Vet. Clin. Equine Pract.* 2014;30(2):383–398. viii.
3. Wild I, Freeman S, Robles D, Matamoros D, Ortiz M, Rodriguez J, Burford J. Owners' knowledge and approaches to colic in working equids in Honduras. *Animals (Basel)* 2021;11(7):2087.
4. Christophersen M.T, Dupont N, Berg-Sørensen K.S, Konnerup C, Pihl T.H, Andersen P.H. Short-term survival and mortality rates in a retrospective study of colic in 1588 Danish horses. *Acta Vet. Scand.* 2014;56(1):1–7.
5. Gitari A, Nguhiu J, Varma V, Mogoa E. Occurrence, treatment protocols, and outcomes of colic in horses within Nairobi County, Kenya. *Vet. World.* 2017;10(10):1255–1263.
6. Gleerup K.B, Lindegaard C. Recognition and quantification of pain in horses: A tutorial review. *Vet. Educ.* 2016;28(1):47–57.
7. Thiemann AK, Sullivan RJE. Gastrointestinal Disorders of Donkeys and Mules. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 2019 Dec;35(3):419–432.
8. Pihl TH, Scheepers E, Sanz M, Goddard A, Page P, Toft N, Kjelgaard-Hansen M, Andersen PH, Jacobsen S. Acute-phase proteins as diagnostic markers in horses with colic. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio).* 2016 Sep;26(5):664–74.
9. Henderson ISF. Diagnostic and prognostic use of L-lactate measurement in equine practice. *Equine Vet Educ* 2013;25(9):468–75.
10. Dondi F, Lukacs RM, Gentilini F, et al. Serum amyloid A, haptoglobin, and ferritin in horses with colic: Association with common clinicopathological variables and short-term outcome. *Vet J* 2015;205(1):50–5.
11. Kilcoyne I, Nieto JE, Dechant JE. Predictive value of plasma and peritoneal creatine kinase in horses with strangulating intestinal lesions. *Vet Surg* 2019;48(2): 152–8.
12. Bardell D, Milner PI, Goljanek-Whysall K, et al. Differences in plasma and peritoneal fluid proteomes identifies potential biomarkers associated with survival following strangulating small intestinal disease. *Equine Vet J* 2019;51(6):727–32.
13. Tesena P, Yingchutrakul Y, Roytrakul S, Taylor J, Angkanaporn K, Wongtawan T. Searching for serum protein markers of equine squamous gastric disease using gel electrophoresis and mass spectrometry. *Equine Vet J.* 2019 Sep;51(5):581–586.
14. Minamijima Y, Niwa H, Uchida E, Yamamoto K. Comparison of the proteomes in sera between healthy Thoroughbreds and Thoroughbreds with respiratory disease associated with transport using mass spectrometry-based proteomics. *J Equine Sci.* 2021 Mar;32(1):11–15,

PARTE GENERALE

1. NOZIONI DI ANATOMIA E FISILOGIA APPLICATA DELL' APPARATO GASTRO-ENTERICO

La conoscenza del funzionamento del tratto gastrointestinale (GI) equino o *gastro-intestinal tract* è fondamentale per meglio comprendere l'eziopatogenesi di una colica. Di seguito sono riportate delle informazioni nozionistiche dell'anatomia e fisiologia di tale comparto corporeo finalizzate per lo più all'espletamento di una corretta attività clinico-diagnostica in questi animali. L'evoluzione del cavallo fornisce una base per comprendere il suo tratto GI.

Questi animali si sono evoluti nelle pianure e nelle steppe del Nord America mangiando erbe fibrose prima di essere addomesticati nell'Eurasia occidentale. Come "animali preda", si adattarono a uno stile di vita errante e di pascolo, mangiando piccoli pasti per almeno 16 ore al giorno. Gli equidi sono erbivori monogastrici capaci di processi fermentativi per la degradazione/digestione degli alimenti fibrosi, quasi esclusivamente nell'intestino crasso. Questa caratteristica permette loro di differire dai ruminanti come bovini, capre, cervi e pecore, che compiono processi simili primariamente nel rumine (uno dei 4 prestomaci) e secondariamente nell'intestino crasso. Quando il tratto GI di un cavallo viene confrontato con quello di altri animali (Tabella 1), emergono differenze fondamentali:

- Lo stomaco dei cavalli è relativamente piccolo, il che spiega la necessità di piccoli pasti continui.
- Il tratto posteriore dell'intestino è relativamente grande e consente la fermentazione ottimale di alimenti fibrosi che costituiscono la maggior parte della dieta equina.¹⁻⁵

Figura 1. *Tratto gastrointestinale del cavallo, che mostra da sinistra a destra lo l'intestino crasso, il fegato, l'intestino tenue, lo stomaco ed il cieco. Immagine proprietà di University of Minnesota College of Veterinary Medicine Minnesota Veterinary Anatomy Courseware Web Site® 2000-2021. <http://vanat.cvm.umn.edu/>.*



Tabella 1. *Percentuali di volume dei diversi tratti del pacchetto gastrointestinale nei suini, ruminanti ed equini.³ Elizabeth Share, Haley M. Zynda, Extension Educator, Wayne County. The Gastrointestinal Tract of the Horse <https://ohioline.osu.edu/factsheet/1022>*

Tratto	Specie		
	Maiali	Ruminanti	Equini
Stomaco	29%	70%	9–10%
Piccolo intestino	33%	19%	30%
Cieco	6%	3%	16%
Restante grosso intestino	32%	7%	45%

1.1 Il Tratto Gastro Enterico Anteriore

Il tratto gastro enterico prossimale o anteriore è costituito da bocca, esofago, stomaco e intestino tenue. I processi digestivi nel tratto gastro enterico anteriore coinvolgono la digestione fisica e chimica con un'azione microbica limitata.

1.2 Cavo orale

La prensione dell'alimento da parte del cavallo avviene principalmente tramite le labbra. Una volta che l'alimento è nel cavo orale, l'animale provvede alla sua masticazione per ottenerne una scomposizione meccanica. I cavalli masticano con un movimento circolare e stridente per ridurre le dimensioni dell'ingesta e aumentare la superficie esposta all'azione degli enzimi a funzione digestiva ed avviare il processo digestivo. Da un punto di vista clinico

la tavola dentaria costituisce fonte di preoccupazione e richiede controlli periodici. Eventuali irregolarità possono precludere la capacità dell'animale di compiere l'atto masticatorio correttamente predisponendo i soggetti affetti ad un aumentato rischio di dismicrobismo, costipazione ed episodi colici.

I cavalli possono produrre circa 36 litri di saliva al giorno per lubrificare l'alimento e contribuire a creare boli che siano facili da deglutire. La saliva ha anche un'azione tampone nello stomaco, aiutando a modulare il pH. Nella saliva equina la quantità di amilasi è relativamente scarsa, quindi, la scomposizione chimica dei carboidrati è minima finché l'alimento non procede nel tratto digestivo. ^{3,4}

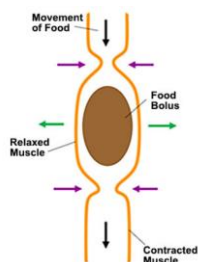
1.3 Faringe ed esofago

Una volta ingerito, il cibo passa attraverso la faringe, un breve tubo muscolare a forma di imbuto situato tra la bocca e l'esofago. L'azione muscolare spinge quindi il cibo nell'esofago. Il cibo o l'acqua non possono tornare in bocca a causa dell'azione simile a una trappola del palato molle a posizionamento sub-epiglottideo. Dopo aver attraversato la faringe, il bolo alimentare entra nell'esofago. Questo semplice tubo muscolare è lungo circa 1,4 m in un cavallo adulto e sposta il bolo alimentare allo stomaco tramite contrazioni muscolari regolari e ritmiche, note come peristalsi (Figura 2). Queste contrazioni spingono in una direzione, contribuendo all'incapacità del cavallo di rigurgitare. Sebbene in questo caso non si verifichi la decomposizione del mangime, le mucose lubrificano il cibo mentre viaggia verso lo stomaco. L'esofago può essere la sede di una condizione nota come ostruzione esofagea. Quando un cavallo ne è affetto la pervietà dell'esofago può essere completamente compromessa. Di conseguenza il cibo ingerito può fuoriuscire dalle narici. Sebbene il cavallo possa respirare, non può mangiare o bere con un'ostruzione esofagea. Pertanto, questa condizione è un'emergenza che coinvolge il primo tratto dell'apparato digerente. Le pratiche per ridurre il rischio di ostruzione comunemente includono l'accesso costante all'acqua, cure dentistiche regolari e lo scoraggiamento dell'alimentazione rapida o del comportamento alimentare frettoloso, in particolare di mangimi in pellet.

Il cibo esce dall'esofago ed entra nello stomaco attraverso un anello muscolare chiamato sfintere cardiaco. Questa valvola

unidirezionale controlla l'ingresso del bolo dall'esofago e impedisce al cibo già ingerito, o ingesta, e al gas di ritornare in esofago.^{3,4}

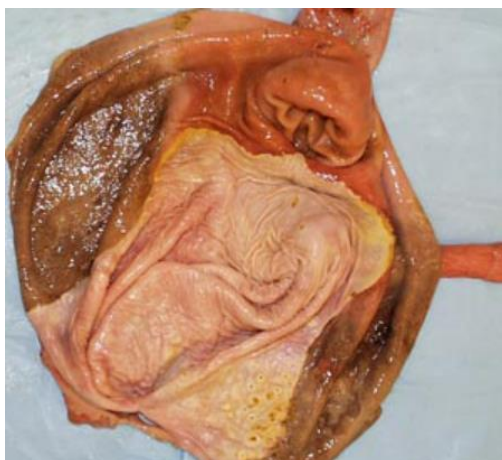
Figura 2. Illustrazione che mostra come la peristalsi, o contrazioni muscolari, nell'esofago spinge un bolo alimentare verso lo stomaco. Elizabeth Share, Haley M. Zynda, Extension Educator, Wayne County. *The Gastrointestinal Tract of the Horse* <https://ohioline.osu.edu/factsheet/1022>



1.4 Stomaco

Una volta che il bolo entra nello stomaco, la digestione chimica continua. Lo stomaco del cavallo è relativamente piccolo rispetto al suo tratto GI totale, costituisce solo il 9% del volume complessivo ed ha una capacità di circa 18 litri. Lo stomaco è classicamente diviso in regione ghiandolare e non ghiandolare (Figura 3).⁵

Figura 3. Le regioni ghiandolari e non ghiandolari dello stomaco di un cavallo. Immagine proprietà di University of Minnesota College of Veterinary Medicine Minnesota Veterinary Anatomy Courseware Web Site® 2000-2021. <http://vanat.cvm.umn.edu/>.



La regione ghiandolare contiene cellule che producono varie secrezioni, tra cui acido cloridrico (HCl) e peptidasi per scomporre le proteine. La digestione microbica che avviene nel compartimento gastrico del tratto GI del cavallo è minima. Si noti che nelle condizioni di pascolo da cui si sono evoluti i cavalli, lo stomaco non era mai vuoto. Nelle moderne situazioni di alimentazione, che spesso comprendono due grandi pasti di concentrato e foraggio, lo stomaco può svuotarsi. Anche vuoto, lo stomaco continua a produrre HCl. Nella regione ghiandolare, le cellule secernono anche muco e bicarbonato per aiutare a proteggere dal pH basso in quella regione dello stomaco. Al contrario, la regione non ghiandolare non ha la stessa protezione. In una tipica dieta del cavallo moderno che include sia concentrato sia foraggio, il cibo a bassa densità o ingerito più recentemente si trova nella parte superiore dello stomaco. Questo alimento mantiene un pH più elevato a causa della continua esposizione alla saliva. Le particelle e il liquido a densità più elevata nella regione ghiandolare inferiore dello stomaco hanno un pH di 1–2 a causa della secrezione acida (Tabella 2). La ridotta assunzione di foraggi grossolani, dovuta al programma di alimentazione o alla mancanza di disponibilità, porta ad una marcata diminuzione del pH nella parte superiore dello stomaco ($\text{pH} \leq 4,0$) che può aumentare il rischio di formazione di ulcere gastriche, in particolare nella parte superiore non ghiandolare.⁶

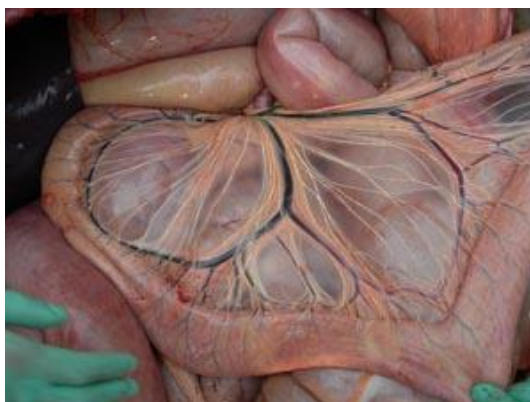
Tabella 2. pH fisiologico raggiunto dall'alimento durante il suo tragitto nel tratto digestivo equino.³ Elizabeth Share, Haley M. Zynda, Extension Educator, Wayne County. *The Gastrointestinal Tract of the Horse* <https://ohioline.osu.edu/factsheet/1022>

	pH
Saliva	7.5
Stomaco	Alimento a bassa densità, foraggi: 6–7
	Alimento ad alta densità, concentrati: 1–2
	Duodeno dell'intestino tenue: 6.3
Piccolo intestino	Digiuno: 7.1
	Ileo: 7.3
Cieco	4,1–7,8
Restante Grosso Intestino	6,3–7,5

1.5 Piccolo Intestino

Per transitare oltre lo stomaco, il chimo fluisce attraverso lo sfintere pilorico, nella prima porzione dell'intestino tenue (Figura 5), il duodeno (divenendo chilo), cui seguono per continuità anatomica il digiuno e l'ileo situato in prossimità della pelvi^{2,6,7}.

Figura 4. Viene visualizzato un segmento dell'intestino tenue con il mesentere che collega l'intestino all'addome. Immagine proprietà di University of Minnesota College of Veterinary Medicine Minnesota Veterinary Anatomy Courseware Web Site® 2000-2021. <http://vanat.cvm.umn.edu/>.



All'interno dell'intestino tenue, gli enzimi secreti dal pancreas e dall'intestino tenue continuano a digerire carboidrati, proteine e

grassi (Tabella 3). I cavalli non hanno la cistifellea, quindi il fegato secerne continuamente la bile per facilitare la digestione dei grassi. Sorprendentemente, i cavalli possono digerire e assorbire livelli relativamente elevati di grassi nella loro dieta nonostante non abbiano quest'organo preposto ad accumulo e concentrazione di bile. Il bicarbonato viene anche rilasciato nel duodeno per tamponare il pH, consentire agli enzimi di funzionare efficacemente e proteggere i rivestimenti intestinali. La seconda e la terza sezione dell'intestino tenue (digiuno e ileo) contengono un gran numero di villi e microvilli che aumentano la superficie dell'intestino e l'assorbimento dei nutrienti digeriti. Il bicarbonato viene nuovamente introdotto nell'ileo, prima della giunzione ileocecale. La quantità di digestione e assorbimento dei nutrienti che avviene nell'intestino anteriore è influenzata dall'entità dell'attività masticatoria dell'alimento, dalla sua velocità di passaggio, dalla sua composizione e dalla biodisponibilità degli stessi.^{2,6,7}

Tabella 3. *Proporzione approssimativa di macronutrienti digeriti e assorbiti.^{3 1} Carboidrati non fibrosi, ovvero principalmente amido. ² Alimentato in quantità limitate; esiste un limite superiore all'inclusione effettiva dei grassi nella dieta. ³ Proteine non legate alle fibre. Elizabeth Share, Haley M. Zynda, Extension Educator, Wayne County. The Gastrointestinal Tract of the Horse <https://ohioline.osu.edu/factsheet/1022>*

Molecole	Digerite	Assorbite
Carboidrati solubili ¹	90%	50-70%
Grassi ²	100%	100%
Proteine ³	50-70%	50-70%

Infatti, cereali di grandi dimensioni possono passare attraverso l'intestino senza essere digeriti in modo ottimale. L'afflusso di nutrienti nell'intestino posteriore può causare disbiosi, meteorismo, episodi di colica fino a causare laminite. In questo senso, alimentare gli equini con piccoli pasti fornendo un apporto energetico attraverso la somministrazione di foraggio può aiutare ad evitare questo genere di problemi.^{2,6,7}

1.5 Grosso intestino

La digestione e l'assorbimento dei carboidrati non strutturali, delle proteine e dei grassi nell'intestino anteriore sono possibili e, per alcuni nutrienti, necessari. Tuttavia, la maggior parte delle diete

equine sono composte da carboidrati strutturali che non possono essere digeriti efficacemente nell'intestino anteriore e vengono invece correttamente fermentati nell'intestino posteriore. La fermentazione comporta la scomposizione di composti ricchi di energia – i carboidrati strutturali presenti nei foraggi – da parte di microrganismi che comunemente comprendono batteri, funghi e protozoi. Questi organismi costituiscono il microbioma del cavallo. I sottoprodotti della fermentazione includono acidi grassi volatili (AGV) che rappresentano una fonte energetica rilevante per l'animale. Gli AGV prodotti dai microrganismi nell'intestino posteriore forniscono la maggior parte del fabbisogno energetico del cavallo e sono in parte il motivo per cui i cavalli sono etichettati come "fermentatori dell'intestino posteriore". ⁷⁻¹⁰

Come detto, il microbioma nel tratto gastrointestinale del cavallo non comprende solo batteri ma anche altri microrganismi come i protozoi. Le proporzioni dei diversi microbi influenzano la capacità del cavallo di scindere ed utilizzare i diversi alimenti. Variazioni nella composizione della flora possono sia favorire sia limitare la colonizzazione di microrganismi potenzialmente dannosi per questa regione un regime alimentare basato su materie prime in quantità e qualità ottimali rappresenta un *condito sine qua non* per garantire salute e benessere dell'organo e dei microrganismi che lo colonizzano. Specie microbiche diverse utilizzano substrati differenti quali fonti di energia e, di conseguenza, creano sottoprodotti diversi, inclusi gli acidi grassi di importanza vitale. La dieta del cavallo fornisce substrati per l'ecosistema di microrganismi all'interno del tratto GI. La popolazione microbica nell'intestino equino è molto sensibile alla composizione e ai cambiamenti della dieta. I microbi presenti nell'intestino equino hanno tolleranze diverse ai cambiamenti della dieta e del pH. (ad esempio, microrganismi amilolitici preferiscono un pH ambientale più acido, mentre quelli cellosolitici sembrano prediligere pH leggermente più alti); eccessive variazioni in un senso o nell'altro possono condizionarne significativamente la sopravvivenza e conseguentemente determinare ulteriori squilibri del pH all'interno dell'intestino posteriore. Le diete a base di foraggio promuovono quindi la salute del tratto gastrointestinale. Se la dieta venisse modificata, anche con un semplice cambio di fieno, dovrebbe essere cambiata lentamente nell'arco di sette-dieci giorni. Questo graduale cambiamento nella dieta consente al microbioma di adattarsi senza causare conseguenze negative al cavallo.⁷⁻¹⁰

Cieco

Una volta che l'ingesta supera l'intestino tenue, entra nell'intestino posteriore attraverso la valvola/giunzione ileocecale.

Questa intersezione a tre vie consente all'ingesta di entrare nel cieco o nell'intestino crasso dall'ileo, oppure di lasciare il cieco ed entrare nell'resto dell'intestino crasso. Il cieco è una grande camera di miscelazione e fermentazione grande e dotata di parete caratterizzata da una nutrita componente muscolare e con una capacità di circa 26 - 38 litri negli animali adulti. Le dimensioni e la conformazione rallentano il passaggio del materiale alimentare,

fornendo alle popolazioni microbiche ivi residenti fino a 7 ore per digerire le sue componenti fibrose. Come detto, l'organo presenta nello spessore della sua parete una importante componente di fibrocellule muscolari che garantisce sia una attività di rimescolamento sia una di propulsione del suo contenuto. A volte una attività contrattile particolarmente vigorosa può generare torsioni o dislocazioni dello stesso comunemente accompagnate da una sintomatologia colica acuta nei soggetti colpiti. A questa condizione possono inoltre associarsi fenomeni di dismicrobismo che, a questo livello, possono rendersi responsabili di meteorismo in grado a sua volta di rallentare/ostruire il transito attraverso la valvola ileocecale contribuendo ad aggravare il quadro clinico.⁷⁻¹⁰

Figura 5. Il cieco di un cavallo. Immagine proprietà di University of Minnesota College of Veterinary Medicine Minnesota Veterinary Anatomy Courseware Web Site® 2000-2021. <http://vanat.cvm.umn.edu/>.



Nel cieco il microbioma è solitamente ampio e diversificato. Sia la dieta che il pH influenzano la diversità e le proporzioni delle diverse specie microbiche. Mentre il bicarbonato secreto nell'intestino tenue aiuta a mantenere il pH ottimale, la fermentazione della fibra digeribile nei foraggi determina la produzione di acidi grassi vegetali (che tendono ad abbassare il pH), metano, anidride carbonica e acqua. In questo tratto la disgregazione delle proteine da parte del microbioma avviene quando queste, legate alle fibre o incapsulate, fuoriescono dall'intestino anteriore con conseguente produzione di ammoniaca, catene di carbonio, amminoacidi e altri composti che i batteri possono utilizzare.

Le vitamine (prevalentemente quelle del gruppo B) vengono infine sintetizzate in quest'area sempre da parte delle popolazioni microbiche residenti⁷⁻¹⁰.

Colon grande, colon piccolo e retto

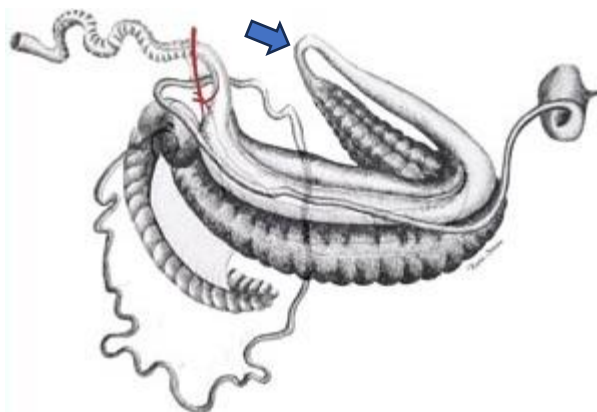
Dal cieco l'ingesta transita quindi nel grande colon attraverso la giunzione ileocecale. Questa porzione del tratto GI del cavallo può contenere fino 75 litri nei soggetti adulti e l'alimento normalmente vi risiede per due o tre giorni, a seconda del tipo di dieta.

Il colon è composto da quattro sezioni:

- ventrale destro
- ventrale sinistro
- dorsale destra
- dorsale sinistro

Il grosso colon si ripiega su se stesso e si restringe, da 20 cm di diametro a 9 cm di diametro, tra la sezione ventrale e quella dorsale. Questa posizione è nota come flessione pelvica (Figura 9). Il restringimento del colon rallenta il passaggio del materiale alimentare, concedendo più tempo alla digestione microbica ottimizzandone l'efficacia. Sfortunatamente, la velocità di passaggio ridotta consente anche alle particelle pesanti, come la sabbia/terra o similari a tal punto da produrre una occlusione del tratto con compressione dei tessuti circostanti, ischemia fino alla necrosi. La flessura pelvica può essere palpata attraverso l'esplorazione trans-rettale coadiuvando la diagnosi di colica da occlusione⁷⁻¹⁰.

Figura 6. Rappresentazione del pacchetto intestinale equino che permette la visione della flessura pelvica (freccia blu). Immagine proprietà di University of Minnesota College of Veterinary Medicine Minnesota Veterinary Anatomy Courseware Web Site® 2000-2021. <http://vanat.cvm.umn.edu/>.



Rispetto al cieco, il microbioma del grosso colon è ancora più vario. Le fermentazioni microbiche in questo tratto continuano con intensità e producono AGV, metano, ammoniaca, vitamine del gruppo B e aminoacidi. Le proteine e gli aminoacidi fuoriusciti dall'intestino anteriore o prodotti nel cieco sono ampiamente utilizzati dai batteri e non sono considerati disponibili per l'assorbimento da parte del cavallo. All'interno del colon, alcuni minerali ed elettroliti, come sodio, cloruro e potassio, vengono assorbiti insieme all'acqua prima che l'ingesta si sposti nel piccolo colon. Quando l'ingesta si sposta in quest'ultimo, entra quindi nella porzione finale del tratto gastrointestinale. La sua funzione primaria è l'assorbimento dei liquidi. A questo livello si formano le scibale che si muovono attraverso il piccolo colon fino al retto per poi essere espulse⁷⁻¹⁰.

1.7 Altri punti chiave

Velocità di transito dell'ingesta

Come affermato in precedenza, i cavalli si sono evoluti con una dieta principalmente a base di foraggi, come l'erba, ad alto contenuto di carboidrati strutturali. Oggi si raccomanda che la loro dieta sia composta per almeno il 50% da foraggio. Una digestione efficiente richiede tempo: la velocità di passaggio gioca un ruolo chiave nell'efficienza con cui il cavallo digerisce, assorbe e utilizza le materie

alimentari prima somministrate. Diversi fattori influenzano la velocità di passaggio del tratto GI, tra cui la composizione della dieta, la dimensione del pasto e la dimensione delle particelle. In generale, pasti abbondanti attraversano il tratto gastrointestinale più velocemente rispetto a quelli piccoli. Le particelle di dimensioni più grandi, come quelle che si trovano nei foraggi a stelo lungo, si muovono più lentamente delle particelle più piccole che si trovano nei cereali lavorati. Bisogna tenere presente che il sovraccarico di qualsiasi sezione del tratto gastrointestinale si traduce in una ridotta efficienza digestiva. Grandi pasti a base di concentrati hanno maggiori probabilità di causare disturbi digestivi, soprattutto se non fanno parte della normale dieta dell'animale. Si consiglia quindi di fornire pasti a base di cereali o concentrati in porzioni piccole frequentemente al fine di rispettare il più possibile la fisiologia digestiva degli equidi.¹

Tratto gastrointestinale e salute

Il rivestimento del tratto gastrointestinale del cavallo costituito da enterociti, microbiota, enzimi digestivi, ormoni, neurotrasmettitori e il sistema vascolare intestinale. La sinergia tra queste componenti garantisce lo svolgimento corretto delle funzioni fisiologiche dell'intestino, quali digestione e assorbimento dei nutrienti, regolazione del metabolismo, funzione di barriera, funzione di regolazione immunitaria. Inoltre, questo complesso ecosistema rappresenta anche una prima linea di difesa contro batteri nocivi, agenti patogeni e tossine che attraversano l'apparato digerente del cavallo. Quando quest'ultimo è compromesso si genera una condizione nota come sindrome dell'intestino permeabile. Ciò consente alle sostanze nocive di passare attraverso la barriera gastrointestinale e causare una serie di problemi, tra cui una infiammazione sistemica, che può contribuire alla laminite, perdita di peso e scarse prestazioni. Ricercatori suggeriscono che la dieta insieme allo stress possono contribuire alla sindrome dell'intestino permeabile. Tutte le strategie per ridurre lo stress e l'infiammazione nel tratto gastrointestinale diminuiscono il rischio che un cavallo sviluppi la sindrome dell'intestino permeabile. Dare priorità al foraggio riducendo amidi e zuccheri nella dieta costituisce l'approccio principale per preservare la salute gastrointestinale degli equini e mantenere al meglio il funzionamento della barriera intestinale.¹

Pratiche di alimentazione moderne

Un errato regime alimentare può innescare disturbi digestivi soprattutto se il cavallo riceve un pasto abbondante, ricco di carboidrati non strutturali. Sovraccaricare l'intestino anteriore con un pasto abbondante a base di cereali può comportare un eccesso di amido e carboidrati solubili che raggiungono l'intestino posteriore. I carboidrati solubili in eccesso che raggiungono l'intestino possono abbassare il pH a causa dei VFA prodotti dai microbi amilolitici. Questa diminuzione del pH complessivo dell'intestino posteriore può provocare conseguenze negative, tra cui la morte microbica, la produzione di endotossine, acidosi metabolica e un aumento del rischio di coliche o laminite. Queste conseguenze possono essere evitate superando il foraggio minimo raccomandato (50% della dieta) e rimanendo al di sotto dei limiti superiori di amido per pasto (2 g/kg di peso corporeo o 2 libbre/1000 libbre) nelle diete dei cavalli (Figura 7 e Tabella 4).¹

Figura 7. *Un cavallo in una stalla.*



Tabella 4. Assunzioni massime per pasto di mangimi comuni e cereali somministrati ai cavalli per evitare di sovraccaricare l'intestino anteriore, con conseguente eccesso di amido e carboidrati solubili che raggiungono l'intestino posteriore.³ Elizabeth Share, Haley M. Zynda, Extension Educator, Wayne County. *The Gastrointestinal Tract of the Horse* <https://ohioline.osu.edu/factsheet/1022>

Alimento	% amido	Assunzioni massime per pasto (obiettivo 2 g/kg di peso corporeo)
<i>Mangimi tradizionali "ad alto contenuto di amido"</i>	50–65	< 1,5–2 Kg
<i>Mangimi con "amido controllato"</i>	15–25	< 4–6,7 Kg
<i>Alimenti a "basso contenuto di amido"</i>	10–12	< 8,3–10 Kg
<i>Mais</i>	70	< 1,4 Kg
<i>Orzo</i>	56	< 1,8 Kg
<i>Avena</i>	45	< 2,2 Kg

* Basato su un cavallo di 500 kg. Altre condizioni possono giustificare un'ulteriore limitazione dell'amido, comprese ulcere gastriche, laminite ricorrente e disturbi metabolici.

I cavalli dovrebbero sempre avere accesso all'acqua in ogni momento e la base principale della dieta dovrebbe essere il foraggio. Se il cavallo necessita di un mangime concentrato o bilanciato a causa della scarsa qualità del foraggio o di una fornitura inadeguata, o perché l'attività dell'animale richiede l'apporto di nutrienti aggiuntivi attraverso la dieta, utilizzare un prodotto appropriato alla situazione. La disponibilità di acqua è fondamentale per l'idratazione, la digestione e la riduzione del potenziale di soffocamento. Somministrare fieno prima del concentrato rallenterà la velocità di passaggio del mangime e ridurrà il rischio potenziale di ulcerazione gastrica.¹

1.8 Bibliografia

1. Elizabeth Share, Haley M. Zynda, Extension Educator, Wayne County. The Gastrointestinal Tract of the Horse <https://ohioline.osu.edu/factsheet/1022>
2. Bell, R. J., T. D. Mogg, and J. K. Kingston. 2007. "Equine Gastric Ulcer Syndrome in Adult Horses: A Review." *N Z Vet J*, Volume 55, Issue 1: 1–12. doi.org/10.1080/00480169.2007.36728.
3. Geor, Raymond, Pat Harris, and Manfred Coenen. 2013. *Equine Applied and Clinical Nutrition*. Amsterdam: Saunders Elsevier. shop.elsevier.com/books/equine-applied-and-clinical-nutrition/geor/978-0-7020-3422-0.
4. Chiavaccini, L., and D. M. Hassel. 2010. "Clinical Features and Prognostic Variables in 109 Horses with Esophageal Obstruction (1992-2009)." *Journal of Veterinary Internal Medicine*, Volume 24, Issue 5: 1147–52. doi.org/10.1111/j.1939-1676.2010.0573.x.
5. Librado, P., N. Khan, A. Fages, M. A. Kusliy, T. Suchan, L. Tonasso-Calviere, S. Schiavinato, et al. 2021. "The Origins and Spread of Domestic Horses from the Western Eurasian Steppes." *Nature*, Volume 598: 634–640. doi: 10.1038/s41586-021-04018-9.
6. NRC (National Research Council). 2007. *The Nutrient Requirements of Horses*, Sixth Revised Edition. Washington DC: National Academy Press. doi.org/10.17226/11653.
7. Stevens, C. E., and I. D. Hume. 1998. "Contributions of Microbes in Vertebrate Gastrointestinal Tract to Production and Conservation of Nutrients." *Physiological Reviews*, Volume 78, Issue 2: 393–427. 10.1152/physrev.1998.78.2.393.
8. Stewart, Amy Stieler, Shannon Pratt-Phillips, and Liara M. Gonzalez. 2017. "Alterations in Intestinal Permeability: The Role of the 'Leaky Gut' in Health and Disease." *Journal of Equine Veterinary Science*, Volume 52: 10–22. doi.org/10.1016/j.jevs.2017.02.009.
9. Blikslager A. Cecal impaction in horses. *Compend Contin Educ Vet*. 2011 Jul;33(7):E1-4. PMID: 23705166.
10. DeNotta SL, Divers TJ. Clinical Pathology in the Adult Sick Horse: The Gastrointestinal System and Liver. *Vet Clin North Am Equine Pract*. 2020 Apr;36(1):105-120. doi: 10.1016/j.cveq.2019.11.004. Epub 2020 Jan 22. PMID: 31982231; PMCID: PMC7127838.

2. EPIDEMIOLOGIA DELLE COLICHE DEL CAVALLO

2.1 Introduzione

Gli studi epidemiologici che indagano sulle coliche forniscono informazioni importanti che possono essere utilizzate per ideare strategie di assistenza sanitaria preventiva basate sull'evidenza per ridurre al minimo il rischio di coliche e assistere un processo decisionale informato riguardante diagnosi, opzioni di trattamento,

e i probabili risultati. L'identificazione dei fattori di rischio per le coliche fornisce anche ulteriori indizi sulla causa, compresi potenziali meccanismi fisiopatologici che giustificano ulteriori ricerche fondamentali di laboratorio. Gli studi epidemiologici in quest'area sono complicati dal fatto che la colica non è una semplice "malattia" ma è una sindrome di dolore addominale che comprende molteplici processi patologici diversi ed è di natura multifattoriale.

Di fondamentale importanza è la capacità di concentrarsi sugli aspetti chiave in relazione alla prevalenza e all'impatto delle coliche, alla prevenzione, alla diagnosi, alle comunicazioni tra Medici Veterinari e proprietari/assistenti riguardo al rischio e alla gestione delle coliche.

2.2 Studi Sulla Popolazione E "Big Data"

Numerosi studi epidemiologici condotti negli anni '90, principalmente negli Stati Uniti, hanno dimostrato che le coliche hanno un impatto significativo sulla salute e sul benessere equino, con un tasso di mortalità compreso tra il 6,7% e l'11%, che rappresenta fino al 28% delle morti equine a seconda della situazione della popolazione studiata.¹⁻³ Nel rapporto 2015 del National Animal Health Monitoring System degli Stati Uniti,⁴ le coliche continuano a essere una delle cause più comuni di morbidità, colpendo dall'1,2% al 4,2% dei cavalli in base alla fascia di età. Nei 12 mesi precedenti lo studio,⁴ la percentuale di cavalli che avevano sviluppato coliche era più bassa nel gruppo di età inferiore a 6 mesi (1,2%), mentre negli altri gruppi era del 2,2% (da 6 mesi a <1 anno di età), 3,1% (da 1 a <5 anni), 2,8% (da 5 a <20 anni) e 4,2% (cavalli di età pari o superiore a 20 anni). Le coliche sono state la causa di morte più comune nei cavalli di età compresa tra 1 e 20 anni, rappresentando il 31,2% dei decessi in questa categoria di età, ed è stata la seconda causa di morte più comune nei cavalli geriatrici

(13,4% dei decessi in questa categoria di età cavalli >20 anni di età, secondi ad “altre cause”, prevalentemente “vecchiaia”).⁴ Queste cifre sono coerenti con i dati di morbidità e mortalità di altri paesi, basati su set di dati sull’assicurazione equina.⁵⁻⁸

Le coliche sono uno dei problemi medici equini più comunemente citati dai Medici Veterinari⁹ e dai proprietari/assistenti di cavalli,^{10,11} compresi i proprietari di equidi da lavoro nei paesi in via di sviluppo.^{12,13} Forme gravi di coliche, che richiedono un intervento chirurgico o l'eutanasia, sono state precedentemente prese in considerazione rappresentano meno del 10% dei casi di coliche valutati dai Medici Veterinari nelle cliniche.^{2,14,15} Tuttavia, uno studio recente ha riportato che il 23,5% dei casi di coliche osservati in 2 cliniche del Regno Unito sono stati classificati come “critici” di natura (definiti come casi che hanno richiesto un trattamento medico o chirurgico intensivo, sono stati sottoposti ad eutanasia o sono morti).¹⁶ Questa differenza è stata considerata molto probabile a causa di una percentuale relativamente maggiore di cavalli anziani in questa popolazione rispetto ai precedenti centri di riferimento. In questa fascia di età, lo strangolamento intestinale dovuto a lipomi peduncolati è più comune, ed è più probabile che i proprietari di cavalli optino per l'eutanasia piuttosto che per un potenziale intervento chirurgico in base alla sola età e/o alle comorbidità associate all'età. Questa cifra potrebbe anche riflettere la maggiore disponibilità e l'uso di trattamenti medici intensivi clinici per la gestione di alcune forme di coliche rispetto a studi condotti più di 20 anni prima. Le coliche sono una causa comune di visite veterinarie fuori orario nelle cliniche equine, essendo l'emergenza equina più comune che richiede assistenza veterinaria e rappresentando il 35% delle visite,¹⁷ e una delle cause più comuni di ricovero d'urgenza negli ospedali di riferimento per animali di grandi dimensioni.¹⁸ Le coliche, pertanto, continuano a essere un problema sanitario chiave per Medici Veterinari e proprietari di cavalli a livello globale e rimangono un obiettivo importante per la ricerca medica.

Identificando fattori di rischio modificabili, gli studi epidemiologici hanno consentito di ideare strategie basate sull'evidenza per ridurre il rischio di coliche.^{19,20} Tuttavia, il grado in cui l'incidenza complessiva delle coliche è cambiata da quando questi fattori di rischio hanno iniziato a essere identificati e quantificati è difficile determinare. Pochissimi studi hanno indagato l'effetto degli interventi

sull'incidenza delle coliche,²¹ e questa è un'area su cui si focalizzeranno le ricerche future. All'interno delle popolazioni equide gestite, l'incidenza delle coliche è stata stimata tra 4 e 26 episodi per 100 cavallo a rischio/anno.¹⁵ La maggior parte degli studi hanno quantificato l'incidenza delle coliche in specifiche popolazioni equine e sono stati utilizzati per estrapolare la probabile incidenza nelle popolazioni equine. Tuttavia, la reale incidenza delle coliche nella popolazione generale degli equidi non è nota. Questi studi sono stati tradizionalmente costosi e richiedono molto tempo per la loro esecuzione. Tuttavia, i progressi tecnologici possono offrire opportunità per una raccolta e un *reporting* più economici e rapidi dei dati ottenuti dai proprietari di cavalli e dai Medici Veterinari sul campo e in ambito ospedaliero. Questi includono la raccolta di dati tramite dispositivi mobili, come telefoni e *tablet*, l'uso di *software* di estrazione per analizzarli e programmi informatici appositamente progettati e altri strumenti elettronici per facilitare la raccolta e il *reporting* dei dati in tempo reale.

L'uso dei "big data" non è un concetto nuovo per le indagini epidemiologiche sulle coliche, utilizzando i dati delle indagini nazionali e i *set* di dati assicurativi come già delineato. Anche negli animali da compagnia lo studio dell'epidemiologia delle differenti patologie ha avuto una notevole diffusione grazie alla presenza di grandi serie di dati di cartelle cliniche provenienti da grandi cliniche veterinarie,²² collaborazioni tra epidemiologi, studi veterinari privati, ed Università. Sebbene esistano sfide riguardanti la privacy, la sicurezza dei dati e le vulnerabilità tecniche, questi *set* di dati su larga scala offrono molte opportunità di ricerca e miglioramenti nella salute degli animali domestici.²⁶ Estrazione di testo da grandi *set* di dati per studiare la prevalenza e la sopravvivenza dei cavalli con malattie croniche²⁷, offrono opportunità per migliorare le indagini epidemiologiche anche sulle coliche equine. Tuttavia, è importante che tali dati siano accurati e possano essere raccolti e analizzati in modo affidabile, compresi i dati raccolti al di fuori delle strutture cliniche, ad esempio durante la pratica ambulatoriale. Per gli studi che indagano le coliche, sono già stati identificati specifici potenziali ostacoli alla raccolta dei dati, come vincoli di tempo, preoccupazioni sulla riservatezza e sull'uso dei dati.³¹ Circa un quarto degli episodi di colica può risolversi spontaneamente senza alcun intervento veterinario,¹⁵ quindi è probabile che l'uso di registrazioni di

trattamenti veterinari o di segnalazioni veterinarie dirette di episodi di coliche sottostimi la reale prevalenza. Altre limitazioni includono errori nella raccolta dei dati, come errori di segnalazione dovuti al fatto che i Medici Veterinari inseriscono dati solo per casi selezionati (ad esempio, forme gravi di coliche) o errori di osservazione, ad esempio, Medici Veterinari che riportano erroneamente i casi di coliche.³² Sebbene esistano limiti e sfide, gli approcci basati sui *big data* offrono, nel complesso, nuove entusiasmanti opportunità nella ricerca epidemiologica sulle coliche.

2.3 Costi ed Accessibilità Delle Cure

L'attuale costo economico delle coliche per l'industria equina globale non è noto. Negli anni '90 è stato stimato l'impatto economico delle coliche sull'industria equina statunitense 115,3 milioni di dollari, di cui il 66% associato alla mortalità dei cavalli.¹ Ai giorni nostri, questi costi saranno invariabilmente e sostanzialmente maggiori dato che le coliche rimangono una causa comune di morbidità e mortalità equina. La popolazione mondiale totale di equidi è stata precedentemente stimata a 112 milioni, di cui 58,5 milioni di cavalli e 53,5 milioni di asini e muli, con gli equidi da lavoro nei paesi a basso reddito e importatori netti di cibo che rappresentano più di un terzo di tutti gli equidi e più del 50% di tutti gli asini.³³ Oltre ai costi economici diretti del trattamento e della mortalità legati alle coliche, malattie come le coliche hanno impatti socioeconomici più ampi in queste ultime popolazioni.³⁴

Anche gli aspetti economici influiscono sul processo decisionale del proprietario e sulle opzioni di trattamento. Durante i periodi di recessione economica globale, i dati provenienti da una popolazione ospedaliera di riferimento degli Stati Uniti e del Regno Unito hanno dimostrato una riduzione della percentuale di cavalli presentati per la valutazione delle coliche sottoposti a trattamento chirurgico e un aumento della percentuale di cavalli sottoposti ad eutanasia.³⁵ Aumenti dei costi delle cure veterinarie a causa dell'inflazione e delle nuove terapie non sono sempre associate ad aumenti paralleli della copertura fornita dalle compagnie di assicurazione,³⁶ e si teme che la chirurgia delle coliche possa diventare insostenibile per alcuni proprietari di cavalli.³⁷ Pertanto, per il trattamento delle coliche devono essere prese in considerazione la tipologia di problema e l'accessibilità economica per i singoli proprietari. Analogamente

all'assistenza sanitaria umana, i costi delle cure mediche veterinarie sono aumentati più velocemente dell'inflazione negli ultimi 20 anni.³⁸ Il principio dell'assistenza basata sul valore è stato utilizzato nell'ambito dell'assistenza sanitaria umana, dove l'assistenza si basa sul principio di ottenere i migliori risultati in base al paziente e al costo più basso.³⁹ È stato proposto lo sviluppo di un quadro di assistenza veterinaria basato sul valore dell'animale.³⁸ Questo concetto si concentra sulla possibilità di fornire assistenza veterinaria ai pazienti di alto valore, considerando nel contempo i possibili risultati e costi. I risultati non dovrebbero essere limitati a quelli che i professionisti veterinari (e quelli in altri campi correlati, ad esempio gli esperti in benessere/etica degli animali) considerano importanti, ma devono essere sviluppati insieme ai proprietari/assistenti dei pazienti veterinari. Ciò includerebbe lo sviluppo e l'uso di risultati riferiti dall'osservatore (proprietario) e di misure della qualità della vita riferite dal proprietario oltre alle attuali misure di risultato *standard*. Gli studi epidemiologici che dimostrano l'efficacia di diversi trattamenti sugli esiti delle coliche, compresi studi interventistici multicentrici ben progettati e le relative analisi costi-benefici, sono aree chiave per la ricerca in corso in questo ambito. Tali studi aiuterebbero i Medici Veterinari ed i proprietari a prendere decisioni informate riguardo al trattamento, in particolare laddove le risorse economiche sono limitate, e potrebbero limitare le opzioni, mantenendo il trattamento delle coliche (e in particolare la chirurgia) il più accessibile possibile per i proprietari di cavalli.

2.4 L'elemento Umano

Oltre a utilizzare un approccio basato sull'evidenza per guidare la gestione dei nostri pazienti, come professionisti, i Medici Veterinari devono anche considerare le modalità con cui si trasmettono ai proprietari degli animali le informazioni provenienti dagli studi epidemiologici sull'assistenza sanitaria preventiva. I proprietari/tutori dei cavalli svolgono un ruolo fondamentale nelle decisioni sulla gestione di routine dei cavalli, che possono avere un impatto sul rischio di coliche. Questi includono il riconoscimento dei segni di colica, le decisioni relative alla richiesta di consulenza veterinaria e la scelta delle opzioni di trattamento, inclusa la potenziale gestione medica o chirurgica. Gli approcci delle scienze sociali sono ampiamente utilizzati in campo medico per comprendere

meglio il comportamento delle persone, compresi gli ostacoli e le motivazioni al miglioramento della salute umana, che possono essere utilizzati per sviluppare strategie educative su misura.⁴⁰ Uno studio britannico ha dimostrato che esistono molteplici tipologie diverse di proprietari con variazioni non solo tra ma anche all'interno di gruppi di proprietari di cavalli (ad esempio professionisti e non professionisti) nel modo in cui riconoscono e gestiscono le coliche.⁴¹ La volontà di contattare tempestivamente il Medico e prendere decisioni riguardanti il trattamento è legata all'atteggiamento primario del proprietario nei confronti delle coliche (ad esempio, alcuni proprietari scelgono di aspettare e vedere, alcuni usano trattamenti empirici dettati dall'esperienza e altri scelgono di contattare subito un professionista), così come gli aspetti finanziari. È stato dimostrato anche che l'atteggiamento dei proprietari era basato sulla loro precedente esperienza di coliche e sulle esperienze dei loro amici e di altri proprietari di cavalli.⁴² A causa delle variazioni nell'atteggiamento dei proprietari di cavalli nei confronti delle coliche e della disparità di conoscenze tra alcuni, non esiste un approccio "unico per tutti" e i Medici Veterinari devono adattare il loro approccio alla comunicazione e all'educazione riguardanti la prevenzione e la cura delle coliche basate sulla conoscenza e sulle percezioni del singolo cliente. Questo approccio può aiutare a sviluppare campagne educative sulle coliche, come la campagna "REACT Now to Beat Colic" della British Horse Society del Regno Unito.⁴³ Per le popolazioni di equidi da lavoro, oltre agli approcci epidemiologici convenzionali,⁴⁴ la formazione dei proprietari ha un ruolo chiave nel fornire informazioni preziose e complementari che possono agevolare il ricorso a trattamenti terapeutici.^{12,34} Questi approcci possono essere utilizzati per migliorare la comprensione delle coliche da parte dei proprietari di cavalli e colmare le lacune nella loro conoscenza riguardo¹³ e contribuire al successivo sviluppo di strategie di intervento per ridurre al minimo il rischio che la patologia si manifesti.

Gli studi epidemiologici hanno anche messo in discussione alcune percezioni comuni dei proprietari di cavalli e di alcuni Medici. Uno di questi esempi è il trattamento chirurgico delle coliche nei cavalli e nei pony geriatrici. Studi epidemiologici hanno dimostrato che cavalli e pony di età superiore a 16 anni hanno maggiori probabilità di essere sottoposti ad eutanasia prima dell'intervento chirurgico, rispetto ai

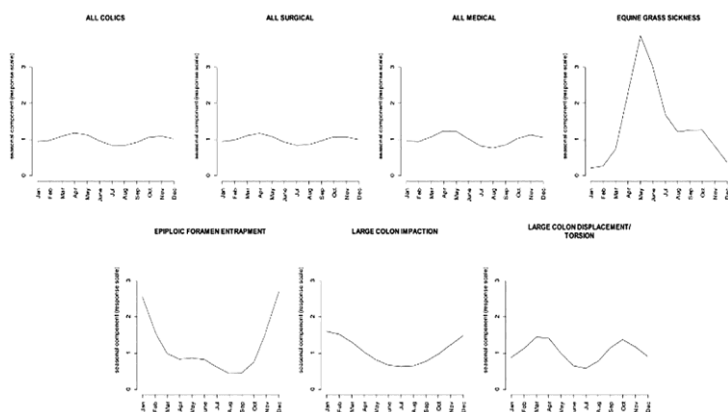
gruppi di età più giovane.⁴⁵ Tuttavia, non vi è evidenza di un aumento del rischio di mortalità postoperatoria nei pazienti geriatrici trattati per strangolamento dell'intestino tenue. malattia da.⁴⁶ I proprietari di cavalli citano comunemente gli scarsi tassi di successo percepiti del trattamento chirurgico e le preoccupazioni sull'incapacità dei cavalli di ritornare allo stato di forma che precedente. Tuttavia, nei cavalli sottoposti a trattamento chirurgico delle coliche che si riprendono dopo l'anestesia, sebbene la prognosi possa variare a seconda di diversi fattori di rischio identificati, gli studi hanno dimostrato che complessivamente dal 74% all'85% dei cavalli sopravvive alla dimissione ospedaliera e dal 63% all'85% alla precedente prestazione atletica.⁴⁷ Pertanto, è importante che i Medici Veterinari possano correttamente presentare le prove disponibili riguardo l'efficacia dei trattamenti conservativi e chirurgici al fine di consentire ai proprietari di cavalli di prendere decisioni informate riguardo alla gestione delle coliche.

2.5 Prevenzione delle coliche

Studi epidemiologici hanno dimostrato che esistono vari fattori di rischio sia a livello di animale sia gestionali (multipli e sovrapposti) che possono condizionare la comparsa del problema.^{19,20,48} Fattori quali età, sesso e razza, possono essere considerati per aiutare a identificare i cavalli a rischio più elevato di forme specifiche di coliche, aiutando il processo decisionale riguardante la probabile diagnosi e le opzioni di trattamento. Laddove i fattori di rischio identificati possono essere modificati, queste evidenze possono essere utilizzate per ideare strategie preventive per ridurre la probabilità di sviluppo di coliche, in particolare nei cavalli che hanno già avuto un episodio di colica. Uno studio longitudinale condotto nel Regno Unito ha dimostrato che tra i cavalli che necessitavano di trattamento medico per le coliche, il 36,5% dei cavalli presentava una recidiva di coliche nei 12 mesi successivi con un tasso di recidiva di 50 eventi di colica per 100 cavallo a rischio/anno, che è molto più alto del rischio di coliche nella popolazione generale.⁴⁹ Pertanto, anche quando si cura un cavallo che presenta un episodio di colica per la prima volta risoltosi dopo trattamento medico, il Medico dovrebbe fornire consigli sulla prevenzione della patologia. I più importanti fattori di rischio identificati sono: la dieta, il tempo trascorso al pascolo o nella stalla, il controllo dei parassiti e la profilassi dentale.

È noto che la geografia e la stagione svolgono un ruolo nel rischio di coliche, che probabilmente riflette un'interazione tra vari fattori ambientali e legati alla gestione. Studi epidemiologici condotti a livello più regionale possono avvisare i Medici Veterinari e i proprietari dell'aumento del rischio di forme specifiche di coliche come quelle causate da enteroliti,^{50,51} duodenite-digiuno prossimale,⁵² o forme più insolite di coliche, come l'enterite eosinofila focale idiopatica.⁵³ Evidenze aneddotiche di possibili variazioni nell'incidenza delle coliche in periodi specifici dell'anno (stagionalità) sono state suggerite in vari studi, ma ciò è difficile da dimostrare utilizzando metodi statistici convenzionali. Nel Regno Unito, questo è stato studiato utilizzando modelli matematici più complessi.^{53,54} In una popolazione ospedaliera, infatti, sono stati identificati modelli stagionali coerenti per i ricoveri per coliche di qualsiasi tipo, di forme specifiche di coliche e per altre (ostruzione di lipoma peduncolato) in cui non c'era evidenza di stagionalità (Figura. 1).⁵⁴ Gli schemi ciclici per tutti i ricoveri per coliche, per quelli di competenza medica e chirurgica, per i grandi spostamenti/volvo del colon coincidevano con i mesi primaverili e autunnali (autunnali), coincidendo con i periodi dell'anno in cui è probabile che i cavalli possano cambiare la dieta, trascorrere periodi al pascolo o fare esercizio fisico. Altri modelli, come l'ostruzione del colon di grandi dimensioni e i ricoveri per intrappolamento del forame epiploico, hanno dimostrato un aumento ciclico costante durante i mesi invernali, periodi dell'anno in cui i cavalli hanno maggiori probabilità di rimanere in box e dove possono verificarsi cambiamenti improvvisi legati alla drastica riduzione del tempo al pascolo con conseguente cambio di dieta.

Figura 8. Andamenti stagionali delle coliche nei casi presentati a un ospedale di riferimento del Regno Unito in un periodo di 10 anni, utilizzando le stime di un modello di regressione bayesiana. Gillen A, Catherine Archer D. *Epidemiology of Colic: Current Knowledge and Future Directions. Vet Clin North Am Equine Pract.* 2023 Aug;39(2):157-174. doi: 10.1016/j.cveq.2023.03.005



2.6 Stalla, affluenza al pascolo ed esercizio fisico

Questi fattori hanno tutti un certo grado di interazione, poiché un cavallo che rimane in stalla per lunghi periodi della giornata avrà anche ridotte opportunità di pascolare al pascolo e una capacità di esercizio più limitata. Studi epidemiologici dimostrano che, in generale, il rischio di coliche viene ridotto evitando cambiamenti improvvisi nell'affluenza e nella stalla, evitando lunghi periodi di tempo trascorso nella stalla e garantendo un'affluenza costante al pascolo.⁵⁵⁻⁵⁷ L'aumento del tempo trascorso al pascolo riduce anche la probabilità di recidiva di coliche nei cavalli successiva ad un episodio di colica medica, rendendolo un intervento importante da considerare nei singoli casi di colica. Per alcuni gruppi di cavalli, come quelli che mostrano un comportamento *cribbing* o "tic d'appoggio", è stato dimostrato che una maggiore probabilità di coliche è direttamente correlata all'aumento delle ore trascorse in stalla ogni giorno e alla diminuzione delle ore di affluenza al pascolo.⁵⁸ Questo è anche un importante fattore di rischio per specifici forme di colica, come la semplice ostruzione/distensione del colon (SODC), dove il rischio è maggiore nei cavalli tenuti in stalla per 24 ore al giorno⁵⁹ e dove è stata identificata anche una recente diminuzione dell'esercizio fisico e del trasporto meno di 24 ore prima per aumentare il rischio di SODC, tutti fattori che contribuiscono alla ridotta motilità

gastrointestinale. Altri esempi di gruppi specifici di cavalli per i quali una maggiore affluenza al pascolo ha un effetto protettivo includono i cavalli a rischio di enterolitiasi.⁵¹

2.7 Dieta

Studi epidemiologici hanno dimostrato che la dieta è un elemento chiave nel rischio di coliche ed è stata al centro di molteplici indagini. Nel complesso, il rischio di coliche in generale viene ridotto evitando cambiamenti improvvisi (della durata <2 settimane) nel tipo e nel lotto di foraggio e cambiamenti nel tipo e nella quantità di concentrato.^{55-57,60,61} Per i cavalli in regioni specifiche, come quelle in cui è presente enterolitiasi è più probabile che si verifichi laddove è più probabile che vengano somministrati tipi di mangime specifici (ad esempio il fieno delle Bermuda costiere).^{50,51,62} La dieta è complessa da valutare, e negli studi epidemiologici, può essere difficile ottenere dati dietetici dettagliati e affidabili, anche in studi prospettici, in particolare in ambienti in cui più persone possono essere coinvolte nella cura quotidiana di un cavallo. Non è chiaro il motivo per cui alcuni tipi di foraggio o polpa di barbabietola da zucchero siano stati associati ad un aumento del rischio di coliche in specifici gruppi di cavalli⁵⁸ o forme specifiche di coliche.⁶⁴ Il tipo di dieta, la quantità e le alterazioni della dieta possono essere tutti fattori associati a cambiamenti a livello molecolare all'interno del sistema gastrointestinale del cavallo.⁶⁵

Gli sviluppi tecnologici hanno portato a importanti progressi nella ricerca molecolare gastrointestinale ed hanno reso queste tecnologie accessibili per la ricerca in campo equino. Numerose ricerche condotte su animali da laboratorio e persone hanno dimostrato che il microbioma intestinale ha effetti su una serie di sistemi ospiti, tra cui il metabolismo, il sistema immunitario e la funzione cerebrale.^{66,67} Lo studio del microbioma equino in condizioni di salute e malattia è un'area importante e attiva della ricerca attuale.⁶⁸ Nei futuri studi epidemiologici, caratteristiche specifiche del microbioma equino potrebbero essere variabili importanti da includere in modelli multi-variabili che studiano il rischio di coliche. Gli studi hanno dimostrato che il microbioma dei cavalli sani varia con la stagione, l'età, dopo il parto e in base a fattori legati alla gestione, inclusi cambiamenti nella dieta, accesso al pascolo, stato di parassiti gastrointestinali e successiva somministrazione di farmaci.⁶⁹⁻⁷⁴ Alterazioni del

microbioma sono stati dimostrati in cavalli con coliche.^{75–77} Tuttavia, sono necessari ulteriori studi per acquisire una maggiore comprensione delle caratteristiche specifiche del microbioma equino e della sua associazione con il rischio di coliche in una gamma di diverse popolazioni equine e diverse forme di coliche. Esiste un enorme potenziale per condurre studi interventistici per manipolare il microbioma attraverso l'integrazione alimentare, come la somministrazione di probiotici,⁷⁸ in particolare nei cavalli che sviluppano episodi ricorrenti di coliche senza causa identificabile. I funghi sono anche componenti chiave della popolazione microbica intestinale,⁷⁹ e gli studi sul microbioma sono in una fase relativamente iniziale nell'attuale ricerca sul tratto gastrointestinale equino. Uno studio recente ha identificato alterazioni del microbioma nel tratto gastrointestinale dei cavalli affetti dalla malattia dell'erba (disautonomia equina o "mal d'erba"),⁸⁰ fornendo importanti e nuove informazioni su questa malattia. È importante che tali studi, compresi gli effetti degli interventi per manipolare le popolazioni microbiche dell'intestino equino, siano ben progettati e utilizzino modelli statistici che tengano conto delle normali differenze tra i singoli cavalli e degli effetti di altri fattori potenzialmente confondenti, come l'affluenza al pascolo e la somministrazione concomitante di farmaci.

2.8 Profilassi delle parassitosi

Studi epidemiologici forniscono prove che la riduzione al minimo del carico di parassiti gastrointestinali attraverso la somministrazione di antelmintici è associata a un ridotto rischio di coliche^{44,55,59,81} e che un elevato carico gastrointestinale della tenia equina (*Anoplocephala perfoliata*) è un importante fattore di rischio per le coliche spasmodiche e l'occlusione ileale (identificata fino all'81% delle volte in coliche da occlusione ileale).⁸² Tuttavia, la somministrazione frequente di antelmintici aumenta la pressione selettiva per la resistenza antelmintica (RA) e l'incapacità di ridurre efficacemente il carico di parassiti gastrointestinali equini a causa dello sviluppo di RA potrebbe aumentare il rischio di coliche. Esistono prove di RA nelle popolazioni strongili in diverse regioni geografiche rispetto a diverse classi di antelmintici utilizzati nei cavalli,^{83,84} e prove che gli effetti del cambiamento climatico possono anche accelerare il fenomeno.⁸⁵ Lo sviluppo di strategie educative in quest'ambito diventeranno sempre

più determinanti per contenere lo sviluppo e diffusione del problema.⁸⁴ Queste ultime comprenderanno senza dubbio l'uso di strategie mirate di trattamento (selettive) ed il mancato ricorso alla somministrazione di antelmintici quale unico mezzo di profilassi delle parassitosi in questa specie.

2.9 Profilassi Dentale

Una grave affezione oro-dentale è da considerarsi quale fattore di rischio per le coliche,⁴⁴ ed è stato identificato che i problemi dentali aumentano il rischio di fenomeni di recidiva⁸⁶ e di occlusione intestinale negli asini.⁸⁷ È stato inoltre dimostrato che la profilassi dentale è associata a un ridotto rischio di coliche SODC⁵⁹ e l'identificazione del comportamento *quidding* o “caduta del bolo durante la masticazione”, spesso associato a una condizione patologica oro-dentale, aumenta il rischio di volvolo del grosso colon.⁶⁴ Pertanto, i proprietari di cavalli dovrebbero essere consapevoli dell'importanza di una valutazione dentale approfondita regolare (6-12 mesi) e di un trattamento appropriato come modo per ridurre il rischio di comparsa di coliche.

2.10 Comportamento Stereotipato

È stato dimostrato che i cavalli che mostrano comportamenti stereotipati orali, incluso il *cribbing*, sono maggiormente a rischio di episodi colici,⁴⁴ casi ricorrenti,⁸⁶ e forme specifiche di SODC⁵⁹ e intrappolamento del forame epiploico.^{88,89} Una volta instaurato, il comportamento di *cribbing* è difficile interrompere, rendendo cruciale il tentativo di prevenire che questo comportamento si sviluppi e si radichi durante i primi anni di vita del cavallo.⁹⁰ Gli interventi per impedire fisicamente ai cavalli questo comportamento rischiano di compromettere gravemente il benessere dei soggetti,⁹¹ e non ci sono prove che tali interventi riducano il rischio di coliche in questi cavalli. È stato anche dimostrato che la gravità del comportamento di *cribbing* è associata ad una maggiore probabilità di una anamnesi in cui precedenti forme di colica siano state osservate.⁵⁸ Questa è un'area che richiede ulteriori ricerche per comprendere meglio la relazione tra l'asse intestino-cervello nei cavalli che mostrano comportamenti stereotipati. Le prove attuali suggeriscono che evitare l'alimentazione con fieno e massimizzare

l'affluenza al pascolo nei mesi autunnali può aiutare a ridurre la probabilità che il fenomeno prenda piede in questi cavalli.⁵⁸

2.11 Processo Decisionale Riguardante la Probabile Diagnosi e il Trattamento

L'identificazione precoce e l'intervento chirurgico per quelle forme di coliche che non possono essere gestite dal punto di vista medico sono fondamentali per una sopravvivenza ottimale e la riduzione delle morbidità postoperatorie. Numerosi studi hanno dimostrato che una ridotta sopravvivenza e un'aumentata incidenza di complicanze postoperatorie sono più probabili nei cavalli con gravi disturbi cardiovascolari prima dell'intervento chirurgico, inclusi aumenti della frequenza cardiaca, del volume delle cellule ematiche, della frazione plasmatica e del lattato peritoneale.¹⁰¹⁻¹⁰³ Tuttavia, in nelle fasi iniziali, molte condizioni che causano dolore addominale e che possono o meno richiedere un intervento chirurgico, si presentano con segni simili. Ciò rende il compito del Medico Veterinario impegnativo, in particolare nelle fasi iniziali della colica e laddove l'uso di *test* aggiuntivi potrebbe non essere una strada facilmente percorribile nell'attività clinica di campo.

Studi epidemiologici hanno dimostrato che esistono diversi fattori di rischio per specifiche forme di coliche, alcuni dei quali possono sovrapporsi ad altre forme. Questi studi quantificano anche l'aumento o la diminuzione del rischio associato a questi diversi tipi di problema (Tabella 1). I Medici Veterinari possono utilizzare un approccio basato sul rischio per considerare la probabilità che un cavallo abbia (o meno) una particolare forma di colica, utilizzando informazioni provenienti dal segnalamento dell'animale, anamnesi, gestione dei soggetti e conoscenza delle informazioni geografiche locali sul rischio di coliche, insieme ai risultati dell'esame clinico e alla risposta all'analgesia. Una diagnosi esatta non è essenziale prima dell'invio ad una struttura in grado di eseguire un intervento chirurgico, quello che conta è il tempismo nell'identificare un malessere verosimilmente dovuto ad uno stato colico del paziente. Aumentare la certezza di una diagnosi specifica attendendo che si sviluppino segni clinici aggiuntivi o in peggioramento rischia di deteriorare lo stato sistemico del cavallo e di potenziale necessità di resezione intestinale, con conseguente riduzione della possibilità di un risultato postoperatorio ottimale. L'identificazione di altri fattori

di rischio che potrebbero corroborare la scelta di ricorrere ad un intervento chirurgico nelle fasi più precoci possibili, in particolare la raccolta di queste informazioni in stalla sembra essere è un'area chiave delle ricerche in ambito ippiatrico e potrebbe avere importanti benefici per la salute e benessere di questi pazienti. Negli ultimi anni, la ricerca si è concentrata sull'identificazione di biomarcatori nel sangue o nel liquido peritoneale che possono essere rilevati nelle prime fasi del processo patologico. Le alterazioni del lattato, dell'amiloide A sierica, dell'aptoglobina e della creatinina chinasi nel sangue periferico e nel liquido peritoneale sono state tutte identificate come biomarker per forme più gravi di malattie gastrointestinali.¹⁰⁴⁻¹⁰⁷ Tuttavia, attualmente mancano prove riguardo alla loro capacità per rilevare in modo affidabile le lesioni chirurgiche utilizzando modelli multi-variabili e, a parte l'uso di lattametri portatili, molti di questi biomarcatori possono essere misurati solo in cliniche adeguatamente attrezzate.

Gli approcci metabolomici e proteomici sono stati ampiamente utilizzati nel campo medico umano per facilitare l'identificazione e la prognosi di pazienti umani con una varietà di condizioni patologiche. È stato dimostrato che i biomarcatori, tra cui L-istidina, acido piruvico e acido stearico, hanno un'applicazione clinica nel migliorare la previsione della sopravvivenza del paziente, nonché la probabilità di morbidità.^{108,109} La risonanza magnetica nucleare e la spettroscopia di massa sono strumenti di *screening* che possono essere utilizzati per valutare un gran numero di biomarcatori sia nei tessuti sia nei biofluidi. Sebbene questo approccio di precisione alla medicina ippiatrica sia in una fase relativamente iniziale, sulle coliche equine gli studi che utilizzano tali tecniche diagnostiche su campioni di sangue e di liquido peritoneale in cavalli affetti da coliche si stanno rapidamente moltiplicando.^{105-107,110} Questi nuovi biomarcatori richiederanno test ed analisi in modelli multivariati per determinare se possano essere in grado di prevedere quali animali svilupperanno una colica, quali potrebbero guarire mediante terapia conservativa, quali mediante trattamento chirurgico ed generale quali possano essere *chances* di guarigione e sopravvivenza.^{105-107,110}

Tabella 5. Fattori di rischio a livello di cavallo e di gestione per forme specifiche di coliche identificati da studi epidemiologici selezionati sulla base di un'adeguata popolazione di controllo.

Tipo di colica	Fattori di rischio	Riferimenti bibliografici
Intrappolamento del forame epiploico	Comportamento di costrizione, storia di coliche nei 12 mesi precedenti, aumento della stabilità nel prima dei 28 giorni, altezza dei soggetti, persona responsabile dell'assistenza quotidiana, mesi invernali, accesso incontrollato a minerali/sale, caratteristiche comportamentali, animali non alimentati contemporaneamente ad altri cavalli	54,88,89
Ostruzione da lipoma peduncolato	Età avanzata, castroni e razza (arabi, <i>quarter horse</i> , da sella, pony)	117, 119
Occlusione ileale	Infezione da <i>Anoplocephala perfoliata</i> , alimentazione con fieno delle Bermuda costiere, assenza di trattamenti antiparassitari	63, 81, 101
Enterite eosinofila focale idiopatica	Giovane età, posizione geografica, periodo dell'anno tra luglio e novembre	53
Volvolo del grosso colon	Aumento dell'altezza del cavallo, episodi multipli di coliche nei 12 mesi precedenti, essere cavalle, cavalle che avevano già partorito, comportamento <i>quidding</i> , assunzione di farmaci (diversi dagli antelmintici) nei 7 giorni precedenti, aumento delle ore di stabulazione nei 14 giorni precedenti, maggior numero di cavalli nell'azienda, 3 o più persone coinvolte nella cura quotidiana del cavallo, alimentazione di fieno, alimentazione di barbabietola da zucchero, cambiamento del pascolo negli ultimi 28 giorni, modifica della quantità di foraggio negli ultimi 7 giorni	64
Semplice ostruzione del colon e distensione	<i>Cribbing</i> , aumento delle ore di stabulazione, recente riduzione dell'esercizio fisico, trasporto nelle 24 ore precedenti, assenza di somministrazione di ivermectina o moxidectina nei 12 mesi precedenti, stabulazione in nuova stalla da meno di 6 mesi, storia di precedenti coliche, ridotta frequenza della profilassi dentale	59
Costipazione del colon nell'asino	Aumento dell'età, razioni extra di mangime, storia pregressa di coliche, lettiera di carta, alimentazione con concentrati, accesso limitato al pascolo, numero crescente di artieri, recente perdita di peso, recente vaccinazione, condizione patologica dentale	87, 120
Enterolitiasi	Somministrazione con fieno di erba medica, somministrazione ≥ 50% della dieta come erba medica, somministrazione <50% della dieta	50, 51, 62

come fieno di avena o fieno d'erba, mancanza di accesso quotidiano al pascolo, $\leq 50\%$ di tempo trascorso all'aperto, razze di cavalli da sella americani, asini, climi secchi, magnesio, ammonio fosforo nella dieta, razze purosangue, trottatori ed animali a "sangue caldo", stalloni

2.12 Bibliografia

1. Traub-Dargatz JL, Kopral CA, Seitzinger AH, et al. Estimate of the national incidence of and operation-level risk factors for colic among horses in the United States, spring 1998 to spring 1999. *J Am Vet Med Assoc* 2001;219(1):67–71.
2. Tinker MK, White NA, Lessard P, et al. Prospective study of equine colic incidence and mortality. *Equine Vet J* 1997;29(6):448–53.
3. Cohen ND. The John Hickman memorial lecture: Colic by numbers. *Equine Vet J* 2003;35(4):343–9.
4. Baseline Reference of Equine Health and Management in the United States, 2015. National Animal Health Monitoring System December 2016 Report 1. Available at: https://www.aphis.usda.gov/animal_health/nahms/equine/downloads/equine15/Eq2015_Rept1.pdf.
5. Leblond A, Villard I, Leblond L, et al. A Retrospective Evaluation of the Causes of Death of 448 Insured French Horses in 1995. *Vet Res Commun* 2000;24(2): 85–102.
6. Penell JC, Egenvall A, Bonnett BN, et al. Specific causes of morbidity among Swedish horses insured for veterinary care between 1997 and 2000. *Vet Rec* 2005;157(16):470–7.
7. Egenvall A, Penell J, Bonnett BN, et al. Demographics and costs of colic in Swedish horses. *J Vet Intern Med* 2008;22(4):1029–37.
8. Higuchi T. A retrospective survey of equine acute abdomen in a breeding region of Japan based on agricultural mutual relief insurance data. *J Equine Sci* 2006; 17(1):17–22.
9. Traub-Dargatz JL, Salman MD, Voss JL. Medical problems of adult horses, as ranked by equine practitioners. *J Am Vet Med Assoc* 1991;198(10):1745–7.
10. Mellor DJ, Love S, Walker R, et al. Sentinel practice-based survey of the management and health of horses in northern Britain. *Vet Rec* 2001;149(14):417–23.
11. Buckley P, Dunn T, More SJ. Owners' perceptions of the health and performance of Pony Club horses in Australia. *Prev Vet Med* 2004;63(1–2):121–33.
12. Upjohn MM, Attwood GA, Lertholli T, et al. Quantitative versus qualitative approaches: A comparison of two research methods applied to identification of key health issues for working horses in Lesotho. *Prev Vet Med* 2013;108(4): 313–20.
13. Wild I, Freeman S, Robles D, et al. Owners' knowledge and approaches to colic in working equids in honduras. *Animals* 2021;11(7). <https://doi.org/10.3390/ani11072087>.
14. Proudman CJ. A two year, prospective survey of equine colic in general practice. *Equine Vet J* 1992;24(2):90–3.
15. Hillyer MH, Taylor FGR, French NP. A cross-sectional study of colic in horses on Thoroughbred training premises in the British Isles in 1997. *Equine Vet J* 2001; 33(4):380–5.
16. Bowden A, England GCW, Brennan ML, et al. Indicators of 'critical' outcomes in 941 horses seen 'out-of-hours' for colic. *Vet Rec* 2020;187(12):492.
17. Bowden A, Boynova P, Brennan ML, et al. Retrospective case series to identify the most common conditions seen 'out-of-hours' by first-opinion equine veterinary practitioners. *Vet Rec* 2020;187(10):404.
18. Dolente BA, Lindborg S, Russell G, et al. Emergency case admissions at a large animal tertiary university referral hospital during a 12-month period. *J Vet Emerg Crit Care* 2008;18(3):298–305.
19. Cohen ND. Epidemiology of colic. *Vet Clin North Am Equine Pract* 1997;13(2): 191–201.
20. Archer DC, Proudman CJ. Epidemiological clues to preventing colic. *Vet J* 2006; 172(1):29–39.
21. Uhlinger C. Effects of three anthelmintic schedules on the incidence of colic in horses. *Equine Vet J* 1990;22(4):251–4.
22. Banfield pet hospital S of PH. No Title.

23. Surveillance S (Small AV. No Title. <https://www.liverpool.ac.uk/savsnet/> Accessed 24 October, 2022.
24. VetCompass. Vet Compass. <https://www.vetcompass.org> Accessed 24 October, 2022.
25. Dogslife Project. No Title. <https://www.ed.ac.uk/roslin/eeagroup/research/dogslife> Accessed 24 October, 2022.
26. Paynter AN, Dunbar MD, Creevy KE, et al. Veterinary big data: When data goes to the dogs. *Animals* 2021;11(7). <https://doi.org/10.3390/ani11071872>.
27. Welsh CE, Duz M, Parkin TDH, et al. Prevalence, survival analysis and multimorbidity of chronic diseases in the general veterinarian-attended horse population of the UK. *Prev Vet Med* 2016;131:137–45.
28. Welsh CE, Parkin TDH, Marshall JF. Use of large-scale veterinary data for the investigation of antimicrobial prescribing practices in equine medicine. *Equine Vet J* 2017;49(4):425–32.
29. EVSNET. Equine Veterinary Surveillance Network. <https://www.liverpool.ac.uk/evsnet/>. Accessed 24 October, 2022.
30. INCISE. International Colic Surgery Audit. <https://www.internationalcolicaudit.com>.
31. Mair TS, White NA II. The creation of an international audit and database of equine colic surgery: Survey of attitudes of surgeons. *Equine Vet J* 2008; 40(4):400–4.
32. Curtis L, Burford JH, Thomas JSM, et al. Prospective study of the primary evaluation of 1016 horses with clinical signs of abdominal pain by veterinary practitioners, and the differentiation of critical and non-critical cases. *Acta Vet Scand* 2015;57(1):1–12.
33. Stringer AP. Infectious diseases of working equids. *Vet Clin North Am - Equine Pract* 2014;30(3):695–718.
34. Stringer AP, Christley RM, Bell CE, et al. Owner reported diseases of working equids in central Ethiopia. *Equine Vet J* 2017;49(4):501–6.
35. Blikslager AT, Mair TS. Trends in the management of horses referred for evaluation of colic: 2004–2017. *Equine Vet Educ* 2021;33(4):192–7.
36. Barker I, Freeman SL. Assessment of costs and insurance policies for referral treatment of equine colic. *Vet Rec* 2019;185(16):508.
37. Archer DC. Colic surgery: Keeping it affordable for horse owners. *Vet Rec* 2019; 185(16):505–7.
38. Pantaleon L. Why measuring outcomes is important in health care. *J Vet Intern Med* 2019;33(2):356–62.
39. Erstad BL. Value-Based Medicine: Dollars and Sense. *Crit Care Med* 2016; 44(2):375–80.
40. Davis E. Donkey and Mule Welfare. *Vet Clin North Am - Equine Pract* 2019;35(3): 481–91.
41. Scantlebury CE, Perkins E, Pinchbeck GL, et al. Could it be colic? Horse-owner decision making and practices in response to equine colic. *BMC Vet Res* 2014; 10(Suppl 1):1–14.
42. Bowden A, Burford JH, Brennan ML, et al. Horse owners' knowledge, and opinions on recognising colic in the horse. *Equine Vet J* 2020;52(2):262–7.
43. The British Horse Society REACT Now to Beat Colic. REACT.
44. Salem SE, Scantlebury CE, Ezzat E, et al. Colic in a working horse population in Egypt: Prevalence and risk factors. *Equine Vet J* 2017;49(2):201–6.
45. Southwood LL, Dolente BA, Lindborg S, et al. Short-term outcome of equine emergency admissions at a university referral hospital. *Equine Vet J* 2009; 41(5):459–64.
46. Southwood LL, Gassert T, Lindborg S. Colic in geriatric compared to mature nongeriatric horses. Part 2: Treatment, diagnosis and short-term survival. *Equine Vet J* 2010;42(7):628–35.
47. Salem SE, Proudman CJ, Archer DC. Prevention of post operative complications following surgical treatment of equine colic: Current evidence. *Equine Vet J* 2016;48(2):143–51.

48. Curtis L, Burford JH, England GCW, et al. Risk factors for acute abdominal pain (colic) in the adult horse: A scoping review of risk factors, and a systematic re- view of the effect of management-related changes. *PLoS One* 2019;14(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219307>.
49. Scantlebury CE, Archer DC, Proudman CJ, et al. Recurrent colic in the horse: Incidence and risk factors for recurrence in the general practice population. *Equine Vet J* 2011;43(SUPPL.39):81–8.
50. Cohen ND, Vontur CA, Rakestraw PC. Risk factors for enterolithiasis among horses in Texas. *J Am Vet Med Assoc* 2000;216(11):1787–94.
51. Hassel DM, Aldridge BM, Drake CM, et al. Evaluation of dietary and manage- ment risk factors for enterolithiasis among horses in California. *Res Vet Sci* 2008;85(3):476–80.
52. Steward SKT, Hassel DM, Martin H, et al. Geographic Disparities in Clinical Characteristics of Duodenitis–Proximal Jejunitis in Horses in the United States. *J Equine Vet Sci* 2020;93. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2020.103192>.
53. Archer DC, Costain DA, Sherlock C. Idiopathic Focal Eosinophilic Enteritis (IFEE), An emerging cause of abdominal pain in horses: The effect of age, time and geographical location on risk. *PLoS One* 2014;9(12):1–19.
54. Archer DC, Pinchbeck GL, Proudman CJ, et al. Is equine colic seasonal? Novel application of a model based approach. *BMC Vet Res* 2006;2. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-2-27>.
55. Cohen ND, Gibbs PG, Woods AM. Dietary and other management factors asso- ciated with colic in horses. *J Am Vet Med Assoc* 1999;215(1):53–60.
56. Cohen ND, Peloso JG. Risk factors for history of previous colic and for chronic, intermittent colic in a population of horses. *J Am Vet Med Assoc* 1996;208(5): 697–703.
57. Hudson JM, Cohen ND, Gibbs PG, et al. Feeding practices associated with colic in horses. *J Am Vet Med Assoc* 2001;219(10):1419–25.
58. Escalona EE, Okell CN, Archer DC. Prevalence of and risk factors for colic in horses that display crib-biting behaviour. *BMC Vet Res* 2014;10. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-10-S1-S3>.
59. Hillyer MH, Taylor FGR, Proudman CJ, et al. Case control study to identify risk factors for simple colonic obstruction and distension colic in horses. *Equine Vet J* 2002;34(5):455–63.
60. Reeves MJ, Salman MD, Smith G. Risk factors for equine acute abdominal dis- ease (colic): results from a multi-center case-control study. *Prev Vet Med* 1996; 26(3–4):285–301.
61. Cohen ND, Matejka PL, Honnas CM, et al. Case-control study of the association between various management factors and development of colic in horses. Texas Equine Colic Study Group. *J Am Vet Med Assoc* 1995;206(5):667–73.
62. Hassel DM, Rakestraw PC, Gardner IA, et al. Dietary risk factors and colonic pH and mineral concentrations in horses with enterolithiasis. *J Vet Intern Med* 2004; 18(3):346–9.
63. Little D, Blikslager AT. Factors associated with development of ileal impaction in horses with surgical colic: 78 Cases (1986–2000). *Equine Vet J* 2002;34(5): 464–8.
64. Suthers JM, Pinchbeck GL, Proudman CJ, et al. Risk factors for large colon volvulus in the UK. *Equine Vet J* 2013;45(5):558–63.
65. Shirazi-Beechey SP. Molecular insights into dietary induced colic in the horse. *Equine Vet J* 2008;40(4):414–21.
66. Fan Y, Pedersen O. Gut microbiota in human metabolic health and disease. *Nat Rev Microbiol* 2021;19(1):55–71.
67. Morais LH, Schreiber HL, Mazmanian SK. The gut microbiota–brain axis in behaviour and brain disorders. *Nat Rev Microbiol* 2021;19(4):241–55.
68. Sanz MG. Science-in-brief: Equine microbiomics makes its way into equine vet- erinary medicine. *Equine Vet J* 2022;54(2):453–4.

69. Costa MC, Arroyo LG, Allen-Vercoe E, et al. Comparison of the fecal microbiota of healthy horses and horses with colitis by high throughput sequencing of the V3-V5 region of the 16S rRNA gene. *PLoS One* 2012;7(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041484>.
70. Costa MC, Stampfli HR, Arroyo LG, et al. Changes in the equine fecal microbiota associated with the use of systemic antimicrobial drugs. *BMC Vet Res* 2015; 11(1):1–12.
71. Peachey LE, Molena RA, Jenkins TP, et al. The relationships between faecal egg counts and gut microbial composition in UK Thoroughbreds infected by cyathostomins. *Int J Parasitol* 2018;48(6):403–12.
72. Slater R, Frau A, Hodgkinson J, et al. A comparison of the colonic microbiome and volatile organic compound metabolome of *Anoplocephala perfoliata* infected and non-infected horses: A pilot study. *Animals* 2021;11(3):1–22.
73. Salem SE, Maddox TW, Berg A, et al. Variation in faecal microbiota in a group of horses managed at pasture over a 12-month period. *Sci Rep* 2018;8(1):1–10.
74. Salem SE, Hough R, Probert C, et al. A longitudinal study of the faecal microbiome and metabolome of periparturient mares. *PeerJ* 2019;7:e6687.
75. Weese JS, Holcombe SJ, Embertson RM, et al. Changes in the faecal microbiota of mares precede the development of post partum colic. *Equine Vet J* 2015; 47(6):641–9.
76. Stewart HL, Southwood LL, Indugu N, et al. Differences in the equine faecal microbiota between horses presenting to a tertiary referral hospital for colic compared with an elective surgical procedure. *Equine Vet J* 2019;51(3):336–42.
77. Stewart HL, Pitta D, Indugu N, et al. Changes in the faecal bacterial microbiota during hospitalisation of horses with colic and the effect of different causes of colic. *Equine Vet J* 2021;53(6):1119–31.
78. Schoster A. Probiotic Use in Equine Gastrointestinal Disease. *Vet Clin N Am Equine Pract* 2018;34(1):13–24.
79. Cui L, Morris A, Ghedin E. The human mycobiome in health and disease. *Genome Med* 2013;5(7). <https://doi.org/10.1186/gm467>.
80. McGorum BC, Chen Z, Glendinning L, et al. Equine grass sickness (a multiple systems neuropathy) is associated with alterations in the gastrointestinal microbiome. *Anim Microbiome* 2021;3(1). <https://doi.org/10.1186/s42523-021-00131-2>.
81. Kaneene JB, Miller R, Ross WA, et al. Risk factors for colic in the Michigan (USA) equine population. *Prev Vet Med* 1997;30(1):23–36.
82. Proudman CJ, French NP, Trees AJ. Tapeworm infection is a significant risk factor for spasmodic colic and ileal impaction colic in the horse. *Equine Vet J* 1998; 30(3):194–9.
83. Peregrine AS, Molento MB, Kaplan RM, et al. Anthelmintic resistance in important parasites of horses: Does it really matter? *Vet Parasitol* 2014;201(1–2):1–8.
84. Rendle D, Austin C, Bowen M, et al. Equine deworming: a consensus on current best practice. *UK-Vet Equine* 2019;3(Sup1):1–14.
85. Sauermann CW, Leathwick DM, Loeffler M, et al. Climate change is likely to increase the development rate of anthelmintic resistance in equine cyathostomins in New Zealand. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 2020;14:73–9.
86. Scantlebury CE, Archer DC, Proudman CJ, et al. Management and horse-level risk factors for recurrent colic in the UK general equine practice population. *Equine Vet J* 2015;47(2):202–6.
87. Cox R, Burden F, Gosden L, et al. Case control study to investigate risk factors for impaction colic in donkeys in the UK. *Prev Vet Med* 2009;92(3):179–87.
88. Archer DC, Pinchbeck GL, French NP, et al. Risk factors for epiploic foramen entrapment colic in a UK horse population: A prospective case-control study. *Equine Vet J* 2008;40(4):405–10.
89. Archer DC, Pinchbeck GL, French NP, et al. Risk factors for epiploic foramen entrapment colic: An international study. *Equine Vet J* 2008;40(3):224–30.

90. Waters AJ, Nicol CJ, French NP. Factors influencing the development of stereotypical and redirected behaviours in young horses: Findings of a four year prospective epidemiological study. *Equine Vet J* 2002;34(6):572–9.
91. Wickens CL, Heleski CR. Crib-biting behavior in horses: A review. *Appl Anim Behav Sci* 2010;128(1–4):1–9.
92. Rotten M, Schubert C, Mosel G, et al. Indications, surgical technique, and long-term experience with laparoscopic closure of the nephrosplenic space in standing horses. *Vet Surg* 2005;34(6):637–41.
93. Nelson BB, Ruple-Czerniak AA, Hendrickson DA, et al. Laparoscopic Closure of the Nephrosplenic Space in Horses with Nephrosplenic Colonic Entrapment: Factors Associated with Survival and Colic Recurrence. *Vet Surg* 2016;45: O60–9.
94. Munsterman AS, Hanson RR, Cattley RC, et al. Surgical technique and short-term outcome for experimental laparoscopic closure of the epiploic foramen in 6 horses. *Vet Surg* 2014;43(2):105–13.
95. van Bergen T, Wiemer P, Bosseler L, et al. Development of a new laparoscopic Foramen Epiploicum Mesh Closure (FEMC) technique in 6 horses. *Equine Vet J* 2016;48(3):331–7.
96. Ragle CA, Yiannikouris S, Tibary AA, et al. Use of a barbed suture for laparoscopic closure of the internal inguinal rings in a horse. *J Am Vet Med Assoc* 2013;242(2):249–53.
97. Rossignol F, Mespoulhes-Riviere C, Vitte A, et al. Standing laparoscopic inguinal hernioplasty using cyanoacrylate for preventing recurrence of acquired strangulated inguinal herniation in 10 stallions. *Vet Surg* 2014;43(1):6–11.
98. Wilderjans H, Meulyzer M. Laparoscopic closure of the vaginal rings in the standing horse using a tacked intraperitoneal slitted mesh (TISM) technique. *Equine Vet J* 2022;54(2):359–67.
99. Pezzanite LM, Hackett ES. Technique-associated outcomes in horses following large colon resection. *Vet Surg* 2017;46(8):1061–7.
100. Arevalo Rodríguez JM, Grulke S, Salciccia A, et al. Nephrosplenic space closure significantly decreases recurrent colic in horses: A retrospective analysis. *Vet Rec* 2019;185(21):657.
101. Proudman CJ, Smith JE, Edwards GB, et al. Long-term survival of equine surgical colic cases. Part 2: Modelling postoperative survival. *Equine Vet J* 2002; 34(5):438–43.
102. Tennent-Brown BS, Wilkins PA, Lindborg S, et al. Sequential plasma lactate concentrations as prognostic indicators in adult equine emergencies. *J Vet Intern Med* 2010;24(1):198–205.
103. Hackett ES, Embertson RM, Hopper SA, et al. Duration of disease influences survival to discharge of Thoroughbred mares with surgically treated large colon volvulus. *Equine Vet J* 2015;47(6):650–4.
104. Peloso JG, Cohen ND. Use of serial measurements of peritoneal fluid lactate concentration to identify strangulating intestinal lesions in referred horses with signs of colic. *J Am Vet Med Assoc* 2012;240(10):1208–17.
105. Henderson ISF. Diagnostic and prognostic use of L-lactate measurement in equine practice. *Equine Vet Educ* 2013;25(9):468–75.
106. Dondi F, Lukacs RM, Gentilini F, et al. Serum amyloid A, haptoglobin, and ferritin in horses with colic: Association with common clinicopathological variables and short-term outcome. *Vet J* 2015;205(1):50–5.
107. Kilcoyne I, Nieto JE, Dechant JE. Predictive value of plasma and peritoneal creatine kinase in horses with strangulating intestinal lesions. *Vet Surg* 2019;48(2): 152–8.
108. Cambiaghi A, Pinto BB, Brunelli L, et al. Characterization of a metabolomic profile associated with responsiveness to therapy in the acute phase of septic shock. *Sci Rep* 2017;7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09619-x>.

109. Wang J, Sun Y, Teng S, et al. Prediction of sepsis mortality using metabolite bio- markers in the blood: a meta-analysis of death-related pathways and prospective validation. *BMC Med* 2020;18(1). <https://doi.org/10.1186/s12916-020-01546-5>.
110. Bardell D, Milner PJ, Goljanek-Whysall K, et al. Differences in plasma and peri- toneal fluid proteomes identifies potential biomarkers associated with survival following strangulating small intestinal disease. *Equine Vet J* 2019;51(6):727–32.
111. Pascoe PJ, Ducharme NG, Ducharme GR, et al. A computer-derived protocol using recursive partitioning to aid in estimating prognosis of horses with abdom- inal pain in referral hospitals. *Can J Vet Res* 1990;54(3):373–8.
112. Reeves MJ, Curtis CR, Salman MD, et al. Prognosis in equine colic patients us- ing multivariable analysis. *Can J Vet Res* 1989;53(1):87–94.
113. Reeves MJ, Curtis CR, Salman MD, et al. Multivariable prediction model for the need for surgery in horses with colic. *Am J Vet Res* 1991;52(11):1903–7.
114. FURR MO, LESSARD P, II NAW. Development of a Colic Severity Score for Pre- dicting the Outcome of Equine Colic. *Vet Surg* 1995;24(2):97–101. <https://doi.org/10.1111/j.1532-950X.1995.tb01302.x>.
115. Farrell A, Kersh K, Liepman R, et al. Development of a Colic Scoring System to Predict Outcome in Horses. *Front Vet Sci* 2021;8. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.697589>.
116. Bishop RC, Gutierrez-Nibeyro SD, Stewart MC, et al. Performance of predictive models of survival in horses undergoing emergency exploratory laparotomy for colic. *Vet Surg* 2022;51(6):891–902.
117. Blikslager AT, Bowman KF, Haven ML, et al. Pedunculated lipomas as a cause of intestinal obstruction in horses: 17 cases (1983-1990). *J Am Vet Med Assoc* 1992;201(8):1249–52.
118. EDWARDS GB, PROUDMAN CJ. An analysis of 75 cases of intestinal obstruc- tion caused by pedunculated lipomas. *Equine Vet J* 1994;26(1):18–21.
119. Garcia-Seco E, Wilson DA, Kramer J, et al. Prevalence and risk factors associ- ated with outcome of surgical removal of pedunculated lipomas in horses: 102 Cases (1987-2002). *J Am Vet Med Assoc* 2005;226(9):1529–37.
120. Cox R, Proudman CJ, Trawford AF, et al. Epidemiology of impaction colic in don- keys in the UK. *BMC Vet Res* 2007;3. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-3-1>.

3. ESEMPI DI COLICHE A CARATTERE INTERNISTICO

3.1 Costipazione Gastrica

Introduzione

Le occlusioni gastriche sono relativamente rare e rappresentano meno del 5% delle cause di coliche nei cavalli.¹ Una diagnosi tempestiva può essere ostacolata dai segni clinici spesso vaghi e lievi. Nel trattamento enterale è preferibile la gestione medica, in particolare con liquidi contenenti anidride carbonica. Sebbene molti cavalli con occlusione gastrica primaria rispondano favorevolmente al trattamento questi soggetti possono andare in contro a recidiva o rottura gastrica come complicanza terminale.

Anamnesi e segni clinici

Possono essere colpiti equidi di qualsiasi razza o età, sebbene il gonfiore gastrico sia insolito negli equidi di età inferiore a 1 anno.^{1,2} Cavalli con ostruzioni gastriche possono avere una storia di malattia acuta (da meno di 24 ore a diversi giorni), cronica o ricorrente. I segni clinici riportati dai proprietari sono generalmente lievi e aspecifici. Il disturbo più comunemente riportato è l'anoressia che può essere accompagnata da segni aspecifici di lieve disagio addominale. Quando i segni di dolore addominale sono evidenti o gravi, è più comunemente presente una concomitante patologia intestinale distale.^{1,2} Reperti clinici riportati meno frequentemente includono disfagia, ridotta produzione di feci, febbre lieve, salivazione e diarrea.^{1,2}

Cause e fisiopatologia

Le occlusioni gastriche possono essere classificate come primarie o secondarie, sebbene la distinzione possa essere difficile da dimostrare senza una celiotomia o un esame *post-mortem* per escludere cause secondarie. I blocchi gastrici possono anche essere classificati a seconda che il materiale trattenuto nello stomaco sia considerato un caratteristico alimento per equidi o vi sia la presenza di materiale scarsamente o indigeribile (ad esempio semi particolarmente indigesti, fito- o tricobenzoari). Un'occlusione gastrica primaria implica che sia insorta spontaneamente senza altra causa sottostante o altra patologia.¹ In uno studio retrospettivo, circa due terzi dei casi erano presumibilmente primari, poiché non è stato

identificato alcun disturbo intestinale aggiuntivo.² Bird e colleghi¹ hanno riferito che 6 dei 7 cavalli con ostruzione gastrica primario che morirono o furono sottoposti ad eutanasia presentavano evidenti segni di ispessimento degli strati muscolari della parete del *saccus ciecus post-mortem*, fino a 10 volte lo spessore dei cavalli di controllo non affetti. Non era chiaro se l'ispessimento della parete dello stomaco fosse la causa o il risultato dell'occlusione gastrica. L'esame istopatologico ha rivelato fibrosi focale o miosite della parete dello stomaco. Due cavalli presentavano anche un evidente ispessimento dell'esofago distale o del piloro.¹ Nonostante i segni *post-mortem* di cronicità, alcuni di questi casi presentavano segni clinici da meno di 24 ore e due di questi presentavano rotture gastriche. Al contrario, in uno studio più recente di 113 casi di occlusione gastrica diagnosticati mediante gastroscopia o celiotomia, solo circa un terzo è stato classificato come malattia primaria. I restanti due terzi dei casi presentavano malattie intestinali concomitanti,⁴ delle quali comprendevano disturbi ostruttivi sia semplici che da strangolamento del tratto intestinale distale.¹

In un recente studio sono stati osservati casi di occlusione gastrica conseguenti a volvolo del colon rendendo molto complessa la distinzione tra malattia primaria e secondaria.⁵ Data la gravità delle occlusioni gastriche in quest'ultima serie di casi, sembra improbabile che il volvolo abbia causato l'occlusione gastrica, anche se la dislocazione parziale cronico del colon prima dello sviluppo del volvolo non può essere escluso come un potenziale contributo all'ostruzione del deflusso gastrico che porta all'occlusione gastrica. È stato proposto che il costipamento gastrico primario cronico contribuisca allo sviluppo del volvolo del colon attraverso cambiamenti nel normale allineamento anatomico del colon e alternazioni nel microbiota, nella pressione intraddominale o nella motilità. Ulteriori condizioni segnalate associate all'occlusione gastrica sono la privazione dell'acqua, l'eccessiva somministrazione di mangimi a base di *pellet*, anomala conformazione della dentatura, patologie epatiche ed il sospetto di dismotilità gastrica.¹

Diagnosi

Considerati i segni vaghi e spesso lievi dell'occlusione gastrica primaria o la presenza di segni più pronunciati di patologia intestinale distale che possono verificarsi con l'occlusione gastrica secondaria, la

diagnosi tempestiva di questa affezione nei cavalli può essere difficile. L'esame obiettivo generale e i risultati di laboratorio rientrano spesso nei limiti della norma o includono risultati aspecifici. L'iperfibrinogenemia è un segno di cronicità e può indicare la presenza di infiammazione murale o peritonite.^{1,2} Sebbene in genere non vi sia reflusso gastrico, può essere difficile far passare il sondino nasogastrico nel lume dello stomaco o il paziente può apparire ansioso o a disagio quando tentativo di ottenere il reflusso gastrico. All'ecografia transaddominale può essere presente un'estensione caudale dello stomaco come evidenza di distensione gastrica se la parete della grande curvatura può essere visualizzata in corrispondenza o oltre il 14° spazio intercostale sinistro.^{1,2} Se un cavallo è stato anoressico per almeno 24 ore o l'intubazione nasogastrica non riesce a correggere l'estensione caudale della parete dello stomaco identificata ecograficamente, la gastroscopia è raccomandata come metodo preferenziale per ottenere una diagnosi definitiva. Le ostruzioni gastriche possono variare nell'aspetto da una concrezione ben formata di ingesta che oscura la capacità di vedere il *margo plicatus* (Figura 1) all'incapacità di entrare nel lume dello stomaco se il materiale che causa il problema si estende allo sfintere esofageo (Figura 2).² Il materiale può infine essere ricoperto di muco e perciò non identificabile. Se non rilevata tramite gastroscopia, un'occlusione gastrica può essere diagnosticata durante la laparotomia esplorativa.

Trattamento

Inizialmente il cibo dovrebbe essere sospeso finché non si ottengono progressi nella riduzione delle dimensioni dell'ostruzione gastrica. In uno studio retrospettivo con 20 casi, è stato riportato che la terapia fluida enterale con o senza lassativi porta alla risoluzione in 5 giorni nel 90% dei cavalli con occlusione gastrica primaria.² Recentemente, Giusto e colleghi⁶ hanno riportato lo sviluppo di volvolo del colon in 4 cavalli dopo il trattamento con un unico grande volume (8 L) di fluido enterale somministrato a pazienti con concomitante occlusione gastrica che non è stata identificata fino alla celiotomia. Non è stato possibile determinare con certezza se l'occlusione gastrica e il trattamento con fluido enterale abbiano portato al volvolo. In tutti e 4 i casi, subito dopo aver ricevuto i fluidi enterali si sono verificati intensi segni di dolore addominale e la

necessità di una celiotomia, portando alla conclusione che l'ulteriore distensione gastrica ha fatto precipitare il volvolo. Pertanto, viene raccomandata la somministrazione enterale frequente di piccoli volumi di acqua o cristalloidi (da 4 a 10 ml/kg) attraverso il flusso per gravità.

L'uso di una liquidi a base di anidride carbonica (ad esempio la cola) da somministrare per via orale per il trattamento dei fitobezoari gastrici nelle persone è stato introdotto circa 2 decenni fa, con il primo rapporto sul suo utilizzo in un cavallo nel 2007.⁷ Successivamente, una serie di casi ha evidenziato il suo utilizzo per il trattamento di fitobezoari gastrici equini con dosi che variavano da meno di mezzo litro a 2 litri due volte al giorno fino a 1 litro ogni ora per 1-3 giorni.⁸

Le preparazioni contenenti caffeina e ad alto contenuto di zucchero devono essere usate con cautela.⁹ Infatti, 2 recenti studi hanno rivelato una probabilità di sopravvivenza alla dimissione significativamente migliore per i cavalli trattati con cola gassata enterale anziché caffeina.^{3,4} Il meccanismo d'azione della cola non è completamente compreso, sebbene i suoi effetti sembrano essere associati all'effetto mucolitico del bicarbonato di sodio, all'effetto acidificante dell'acido carbonico e fosforico, nonché alla penetrazione e rottura da parte delle bolle di anidride carbonica.⁹ Si ritiene che qualsiasi bevanda gassata possa avere effetti benefici per il trattamento.¹⁰ Le bevande analcoliche, come la cola, sono probabilmente le più convenienti per l'uso nei cavalli. Ulteriori trattamenti enterali utilizzati con successo per le occlusioni gastriche sono il solfato di magnesio, il diottil solfosuccinato di sodio e il sorbitolo.^{2,6} Il trattamento medico è preferibile, sebbene vi siano recenti segnalazioni di successo di gastrotomia nel cavallo adulto.^{11,12}

Si raccomanda vivamente una gastroscopia di *follow-up* al termine della terapia per garantire la risoluzione definitiva dell'occlusione e per valutare completamente la mucosa gastrica, poiché vengono segnalate ulcere gastriche sia ghiandolari sia ghiandolari.² L'occlusione recidiva in alcuni casi, in particolare quando viene diagnosticata come malattia primaria; pertanto, si consiglia un'ulteriore gastroscopia di *follow-up* dopo la dimissione.^{1,2}

Il successo del trattamento per l'occlusione gastrica è variabile, con una sopravvivenza alla dimissione che varia dallo 0% nei cavalli con concomitante volvolo del colon⁵ al 90% per i cavalli con

occlusione gastrica primaria.² Il tasso di sopravvivenza globale sui dati comprendenti 238 casi da 2 recenti segnalazioni è stato di circa il 60%.^{3,4} Non è stata riscontrata alcuna differenza nella sopravvivenza alla dimissione per i cavalli con malattia primaria (23/40; 58%) e secondaria (45/73; 62%).⁴ Il tasso di complicanze con la malattia primaria può essere più elevato in caso di segnalazioni di recidiva^{1,2} e una maggiore probabilità di progredire verso la rottura gastrica.⁴

Figura 9. *Aspetto endoscopico di una discreta concrezione di ingesta ricoperta di muco in un cavallo con vaghi segni di anoressia e ridotta prestazione sportiva. Sullo sfondo c'è la maggiore curvatura dello stomaco.* Barton MH, Hallowell GD. *Current Topics in Medical Colic. Vet Clin North Am Equine Pract.* 2023 Aug;39(2):229-248. doi: 10.1016/j.cveq.2023.03.008.



Figura 10. *Aspetto endoscopico di un'occlusione gastrica estesa al cardias in un asino (a sinistra) e in un cavallo (a destra).* Barton MH, Hallowell GD. *Current Topics in Medical Colic. Vet Clin North Am Equine Pract.* 2023 Aug;39(2):229-248. doi: 10.1016/j.cveq.2023.03.008.



3.2 Malattia Ghiandolare Gastrica Equina

Introduzione

È ormai ampiamente accettato che la malattia ghiandolare gastrica equina (MGGE) sia un'entità separata dalla malattia gastrica squamosa equina (MGSE)¹³ e questa sezione fornisce un aggiornamento. Studi recenti hanno dimostrato che i fattori di rischio¹⁴ e la risposta al trattamento^{15,16} dell'MGGE differiscono dall'MGSE. Ciò è probabilmente dovuto alle differenze nell'anatomia e nella fisiologia delle due regioni dello stomaco. Negli ultimi 10-15 anni si è assistito ad un aumento delle identificazioni e delle segnalazioni di prevalenza dell'MGGE e la maggior parte ritiene che questo sia un vero cambiamento nella prevalenza della malattia.

Tuttavia, nonostante numerose pubblicazioni recenti, ambo le condizioni richiedono ancora mancano ancora conoscenze su questa condizione.

Anamnesi e segni clinici

I segni clinici probabilmente associati all'MGGE includono cambiamenti nel temperamento, inclusi nervosismo e aggressività, una ridotta disponibilità al lavoro e riluttanza ad andare avanti; perdita di peso inspiegabile, probabilmente contemporaneamente associata a ridotto appetito o alterazioni delle abitudini alimentari; sensibilità cutanea che si manifesta con morsicature sui fianchi, risentimento nei confronti del sottopancia, degli aiuti alle gambe o del tappeto; dolore addominale lieve e/o ricorrente.¹³ È improbabile che cambiamenti nelle condizioni del mantello, nel comportamento stereotipato, nel bruxismo e nella diarrea siano associati all'MGGE.¹³

La sensibilità cutanea sembra un segno clinico non plausibile di malattia gastrica. Tuttavia, dati provenienti da altre specie suggeriscono che le vie afferenti dai visceri addominali e dal VI al IX nervo spinale toracico sono raggruppate, in modo tale che i segnali afferenti dalla pelle possono essere influenzati dall'*input* dallo stomaco e interpretati erroneamente all'interno del cervello. Inoltre, i riflessi visceri-somatici possono provocare dolore e sensibilità in strutture segmentalmente correlate, come la pelle.¹⁷

Causa e fisiopatologia

La prevalenza dell'MGGE negli studi clinici su vari tipi di cavalli in tutto il mondo è compresa tra il 47% e il 65%.¹⁸⁻²³ Aneddoticamente, si ritiene che la prevalenza di questa condizione sia aumentata negli ultimi 15 anni circa.

I fattori di rischio per l'MGGE sono limitati e talvolta contraddittori, ma sono molto diversi da quelli dell'MGSE. I cavalli a "sangue caldo" corrono un rischio maggiore di sviluppare MGGE rispetto ad altri tipi di cavalli.^{20,24} Nei cavalli da corsa purosangue, il fantino è stato identificato come un rischio indipendente da altri fattori di gestione.¹⁴ È stato dimostrato che l'esercizio per più di 4 o 5 giorni alla settimana è un fattore di rischio nei cavalli da corsa¹⁴ e nei cavalli sportivi,²⁵ mentre l'intensità dell'esercizio non lo era. Più un cavallo è esperto nella sua disciplina, minore è la prevalenza di MGGE,^{25,26} che può suggerire differenze di adattamento al lavoro o di

gestione dei cavalli d'élite.¹³ Uno studio su cavalli da *endurance* ha dimostrato una maggiore prevalenza di MGGE nella stagione agonistica,²³ che può riguardare la riduzione del flusso sanguigno gastrico durante l'esercizio prolungato.

I cavalli con MGGE grave hanno aumentato il cortisolo in risposta a nuovi stimoli²⁷ e in risposta all'ACTH esogeno,²⁸ suggerendo una maggiore sensibilità allo stress. L'associazione tra MGGE e stereotipie è conflittuale; in uno studio non è stata trovata alcuna associazione,¹⁴ mentre in un altro è stata trovata un'associazione con il tic d'appoggio.²⁹ Queste differenze possono essere spiegate dall'elevata prevalenza di MGGE e dal comportamento stereotipato in queste popolazioni, prevalentemente di cavalli da corsa.^{14,29} Sarebbe più interessante valutare la prevalenza della malattia nei cavalli a cui viene impedito di esibire comportamenti stereotipati, poiché la rimozione delle strategie di *coping*, almeno negli esseri umani, è considerata stressante. La minore prevalenza di MGGE nei *pony* da polo e nei saltatori più esperti^{25,30} può essere correlata all'adattamento allo stress fisiologico. I cavalli più esperti da esposizione e da salto ostacoli hanno concentrazioni plasmatiche di cortisolo più basse rispetto ai cavalli meno esperti.^{31,32} È difficile sapere cosa sia "stressante" per un singolo cavallo e, come tale, i cambiamenti per ridurre al minimo lo *stress* dovrebbero essere adattati al singolo individuo e al suo comportamento. idealmente mantenuto coerente.

Finora non è stata documentata alcuna associazione tra il coinvolgimento di agenti infettivi,^{19,21} l'uso di farmaci antinfiammatori non steroidei in casi clinici,^{14,24} la dieta o la zoppia con l'MGGE.^{13,14}

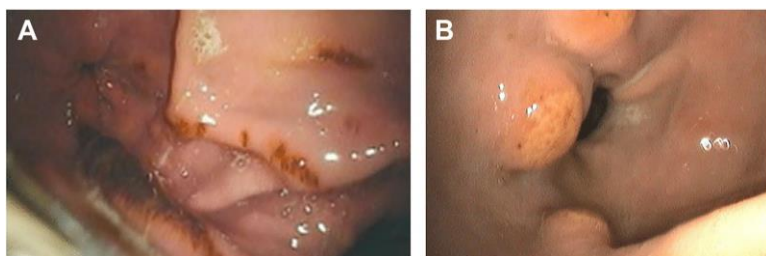
Le lesioni della mucosa ghiandolare solitamente non sono ulcerative. Queste lesioni sono di natura erosiva e infiammatoria, costituite da una popolazione infiammatoria mista (linfociti, plasmaciti e neutrofili) e, come tali, le lesioni sono meglio descritte come gastrite ghiandolare.^{19,21,33} La mucosa ghiandolare differisce da quella ghiandolare. mucosa squamosa in quanto è adattata all'ambiente altamente acido (pH da 1 a 3) in cui viene abitualmente bagnata.³⁴ È quindi probabile che l'MGGE possa derivare da una rottura dei normali meccanismi di difesa che proteggono la mucosa (bicarbonato e muco gastrico costituito da glicoproteine, acqua, elettroliti, lipidi e anticorpi).³⁵

La fisiopatologia proposta per queste lesioni comprende cambiamenti nel flusso sanguigno con o senza perpetuazione di queste lesioni a causa dell'esposizione all'acido o come estensione della malattia infiammatoria intestinale (MII).¹³ Le riduzioni del flusso sanguigno possono essere secondarie allo *stress*, che influenza produzione di gastrina o è correlato all'esercizio fisico e all'alimentazione.¹³ Uno studio recente ha rilevato che i cavalli con MGGE avevano proteine salivari sovra regolate relative all'attivazione immunitaria rispetto ai cavalli normali, il che potrebbe supportare la proposta che l' MGGE sia una manifestazione di MII poiché ciò suggerisce ulteriori prove che l'MGGE è una malattia infiammatoria.³⁶

Diagnosi

La gastroscopia rimane l'unico metodo affidabile per la diagnosi con la maggior parte delle lesioni localizzate attorno al piloro e nell'antro (Figura 3).¹⁴⁻¹⁶ È ormai ampiamente accettato che il sistema di classificazione per l'MGGE non riflette la gravità della malattia. Fino a quando non verrà sviluppato un sistema migliore, si raccomanda di descrivere le lesioni basandosi sulla dichiarazione di consenso ECEIM-ACVIM.³⁷ Questi descrittori includono quanto segue: focale, multifocale e diffusa; lieve, moderato e grave; nodulare, rialzato, piatto o depresso; eritematoso, emorragico o fibrino-suppurativo. Una dichiarazione di consenso più recente incentrata sull'MGGE ha suggerito che le lesioni piatte ed eritematose guariscono più rapidamente rispetto alle lesioni con aspetto nodulare, sollevato, fibrino-suppurativo o emorragico.³⁸ L'accordo riguardo a questi descrittori varia da discreto a moderato³⁹ e da moderato a buono⁴⁰ ed è stato meglio tra i diplomati ACVIM/ECEIM rispetto ad altri Medici Veterinari.³⁹ La mancanza di consenso e la mancanza di metodi affidabili per classificare la gravità delle lesioni rendono difficile eseguire studi clinici e sperimentali su questa malattia. Sono state documentate differenze nel microbiota gastrico tra cavalli sani e quelli con MGGE,^{41,42} ma ciò che attualmente è incerto è se queste siano causa o effetto e come possano essere utilizzate clinicamente.

Figura 11. Due aspetti comuni, ma molto diversi, di lesioni ghiandolari gastriche. (A) Alcune lesioni multifocali, piatte, emorragiche. (B) Lesione unifocale, rilevata, fibrinosuppurativa. Barton MH, Hallowell GD. *Current Topics in Medical Colic. Vet Clin North Am Equine Pract.* 2023 Aug;39(2):229-248. doi: 10.1016/j.cveq.2023.03.008.



Trattamento

È ormai ampiamente accettato che le opzioni di trattamento e gestione per MGSE ed MGGE siano diverse. In una recente dichiarazione di consenso sono state proposte tre o quattro combinazioni di trattamenti: omeprazolo orale (4 mg/kg ogni 24 ore) combinato con sucralfato (12 mg/kg ogni 12 ore), misoprostolo orale (5 mg/kg ogni 12 ore) con o senza sucralfato (12 mg/kg ogni 12 ore); omeprazolo intramuscolare a lunga azione (4 mg/kg ogni 5-7 giorni), disponibile in alcuni paesi o in combinazioni terapeutiche per le MII.

Il sucralfato fornisce una barriera fisica che impedisce la diffusione acida, stimola la secrezione di muco, che blocca la diffusione acida, inibisce la secrezione di pepsina e acidi biliari, promuove l'epitelizzazione prevenendo la degradazione dei fibroblasti, stimola i fattori di crescita epidermici e insulino-simili e aumenta il flusso sanguigno della mucosa attraverso una maggiore produzione di prostaglandina E2 (PGE). La risposta alla terapia orale con omeprazolo e sucralfato varia con la guarigione riportata nel 22%-63% dei cavalli^{35,43}; questa differenza probabilmente si riferisce a diverse definizioni di guarigione. Quando utilizzato, l'omeprazolo deve essere somministrato a stomaco vuoto e a digiuno per altri 30-60 minuti dopo la somministrazione.¹³

Il misoprostolo è un analogo della PGE che probabilmente migliora il flusso sanguigno della mucosa. Sopprime inoltre la produzione di acido nel cavallo⁴⁴ e inibisce l'infiammazione neutrofila.⁴⁵ Uno studio⁴³ ha dimostrato la guarigione dell'MGGE nel 73% dei cavalli. Gli effetti collaterali sono rari e comprendono diarrea lieve e transitoria, lieve dolore addominale e orticaria. È necessario

prestare attenzione nella somministrazione alle cavalle gravide, poiché questo farmaco potrebbe indurre l'aborto, sebbene vi siano alcuni dati di sicurezza che suggeriscono che possa essere somministrato tra 100 e 130 giorni di gestazione.⁴⁶ A causa del potenziale abortigeno, il misoprostolo non deve essere somministrato alle donne che potrebbero essere incinte o che stanno pianificando una gravidanza. Non esiste alcun razionale per combinare questo farmaco con omeprazolo orale.¹³

L'omeprazolo intramuscolare a lunga durata d'azione è più efficace delle formulazioni orali nella soppressione acida quando il pH viene misurato nella porzione ventrale dello stomaco.⁴⁷ La soppressione acida viene mantenuta per 4-7 giorni e come tale deve essere somministrata a intervalli di 5-7 giorni. Secondo quanto riferito, la guarigione si è verificata nel 64%-75% dei cavalli.^{47,48} Un gonfiore transitorio nel sito di iniezione è stato segnalato in meno del 10% dei casi ed è quindi raccomandato che venga somministrato dopo il riscaldamento.

Potrebbe esserci qualche fondamento logico per la somministrazione di glucocorticoidi, che sono stati riportati aneddoticamente come efficaci. È stata proposta la somministrazione iniziale di 1 mg/kg di prednisolone per via orale ogni 24 ore o di 0,05-0,1 mg/kg di desametasone per via orale ogni 24 ore, che viene poi gradualmente ridotta nel corso di 4-5 settimane.¹³ Altre raccomandazioni includono la semplificazione della dieta, in base alla quale le proteine dei cereali o l'erba medica può svolgere un ruolo nell'inizio o nella perpetuazione delle MII. Una piccola percentuale di casi sviluppa noduli iperplastici molto grandi (Figura 4) che rischiano di ostruire il deflusso pilorico. Questi casi possono richiedere la rimozione trans endoscopica mediante termocauterizzazione.¹³

Non ci sono prove per la somministrazione di antibiotici, ranitidina, aloe vera, complessi pectina-lecitina, polisaccaridi, caolino, subsalicilato di bismuto, olivello spinoso, agopuntura o omeopatia per il trattamento dell'MGGE.¹³ Per lesioni concomitanti MGSE ed MGGE, il trattamento dovrebbe essere rivolto all'MGGE.

Figura 12. Alcune lesioni multifocali in rilievo che circondano il piloro in un cavallo incrociato da tiro irlandese di 12 anni che presentava coliche ricorrenti e ostruzioni gastriche intermittenti. Queste lesioni non hanno risposto alle combinazioni terapeutiche comunemente utilizzate per l'MGGE (omeprazolo iniettabile, misoprostolo e sucralfato orali, desametasone orale) e quindi sono state rimosse utilizzando una tecnica di cauterizzazione transendoscopica. Dopo la rimozione, i segni clinici del cavallo si sono risolti. Barton MH, Hallowell GD. *Current Topics in Medical Colic. Vet Clin North Am Equine Pract.* 2023 Aug;39(2):229-248. doi: 10.1016/j.cveq.2023.03.008.



Esito e prevenzione delle recidive

I tassi di guarigione dell'MGGE sono lenti rispetto all'MGSE e imprevedibili. Le lesioni rilevate, nodulari e fibrinosuppurative possono richiedere più tempo per guarire rispetto alle lesioni piatte ed emorragiche. Sebbene la restituzione della mucosa possa avvenire entro 3-5 settimane, la malattia gastrica equina può richiedere diversi mesi per risolversi completamente, soprattutto dove sono visibili aree sollevate o noduli. Idealmente, la valutazione dovrebbe essere eseguita ogni 6-8 settimane mediante gastroscopia fino alla risoluzione della malattia, e solo allora il trattamento dovrebbe essere interrotto. Non esiste alcuna motivazione per ridurre la dose dei farmaci ad eccezione dei glucocorticoidi.

Se al riesame non si riscontra alcun miglioramento o peggioramento dell'aspetto della lesione, si consiglia di passare ad un trattamento alternativo. Se si riscontra un miglioramento, il trattamento deve essere continuato per un massimo di 3 mesi e, a questo punto, considerare trattamenti alternativi se non guarisce.

La prevenzione della malattia gastrica equina è problematica. Sulla base dei fattori di rischio noti, i cavalli dovrebbero avere 2 giorni di riposo a settimana; lo stress dovrebbe essere ridotto al minimo (ambienti tranquilli, numero minimo di operatori sanitari e gli stessi

compagni di campo equini) e il rendimento dovrebbe essere massimizzato. Evita qualsiasi integratore irritante, come il solfato di magnesio. L'olio di mais (da 150 a 250 ml/giorno/500 kg) può essere utile a scopo preventivo, poiché diminuisce la produzione di acido gastrico e aumenta la PGE,⁴⁹ così come l'uso di pectina-lecitina come protettivo della mucosa a 150 g ogni 12 ore.⁵⁰

3.3 Malattia Infiammatoria Intestinale

Introduzione

L'MII è associata a segni clinici di perdita di peso, diarrea e/o coliche ricorrenti.⁵¹ I segni clinici sono probabilmente dovuti a cambiamenti nell'assorbimento di nutrienti e acqua e agli effetti sulla motilità gastrointestinale.⁵¹ L'MII è probabilmente determinata da una risposta immunitaria inappropriata batteri, virus, parassiti e allergeni alimentari.⁵¹ La diagnosi di MII si ottiene utilizzando una varietà di tecniche, tra cui test di assorbimento orale anomalo del glucosio o dello xilosio, aumento dello spessore della parete intestinale alla valutazione ecografica transaddominale, biopsie rettali a spessore parziale e duodenali transendoscopiche o biopsie intestinali a tutto spessore.⁵² La pubblicazione sentinella dei primi anni 2000 ha costituito un punto di riferimenti nefasto.⁵¹ La prognosi sfavorevole riportata dagli autori è stata recentemente messa in discussione in un'altra pubblicazione prospettica più ampia, in base alla quale la risposta iniziale alla terapia era del 75% con una sopravvivenza a 3 anni riportata essere 65%.⁵²

Anamnesi e segni clinici

I segni di presentazione più comuni sono perdita di peso, perdita di peso combinata a coliche ricorrenti, esclusivamente coliche ricorrenti,⁵² e in alcuni sottotipi di MII, diarrea e inappetenza.⁵² Si osserva edema ventrale secondario a ipoalbuminemia.^{52,53}

Epidemiologia e fisiopatologia

Si sa poco sull'epidemiologia delle MII nei cavalli. Tuttavia, estrapolando le conoscenze da altre specie, in particolare esseri umani e cani, si può supporre che esista una relazione complessa tra genetica, ambiente, batteri, virus, parassiti, proteine di cereali e carne.⁵⁴ I ruoli relativi di questi fattori sono in qualche modo controverso; tuttavia, è accettato che il microbiota enterico negli

esseri umani svolga un ruolo centrale nella patogenesi delle MII.^{55,56} Esiste uno studio che suggerisce che il glutine possa svolgere un ruolo nelle MII nei cavalli, ma sono necessari ulteriori studi per accertare se questo sia il caso.⁵⁷

Nel cavallo sono descritti cinque tipi di MII che possono colpire l'intestino tenue e crasso: enterocolite linfoplasmocitica, enterite granulomatosa (EG), enterocolite eosinofila diffusa, enterocolite eosinofila focale idiopatica e malattia epiteliotropica eosinofila multisistemica (MEEM).⁵¹ È stato proposto un sottotipo che colpisce solo l'intestino crasso con identificazione *post-mortem* e somiglia alla colite ulcerosa nell'uomo sia macroscopicamente che istopatologicamente; la rilevanza clinica deve ancora essere chiarita. MEEM e EG sono gli unici sottotipi di MII con malattia nei tessuti oltre il tratto intestinale. Nella MEEM sono comunemente riportati cambiamenti nella pelle e in altri organi, mentre nella EG si possono osservare cambiamenti nella pelle e nei linfonodi.⁵³ EG e MEEM sono stati segnalati più comunemente nei cavalli di età inferiore a 4 anni con una maggiore prevalenza negli esemplari standard⁵¹; la predilezione della razza può suggerire l'esistenza di una componente genetica.⁵⁸ Gli altri 3 sottotipi sono stati identificati in cavalli di qualsiasi età e in una varietà di razze.⁵¹⁻⁵³

È stato proposto che l'enterocolite linfocitico-plasmocitaria possa essere un precursore del linfoma intestinale come in altre specie.^{51,53,59,60} La EG presenta somiglianze istopatologiche con la malattia di Crohn nell'uomo e può essere associata ad anemia, probabilmente secondaria a ridotta assorbimento di nutrienti o associato a malattie croniche.⁵¹

Diagnosi

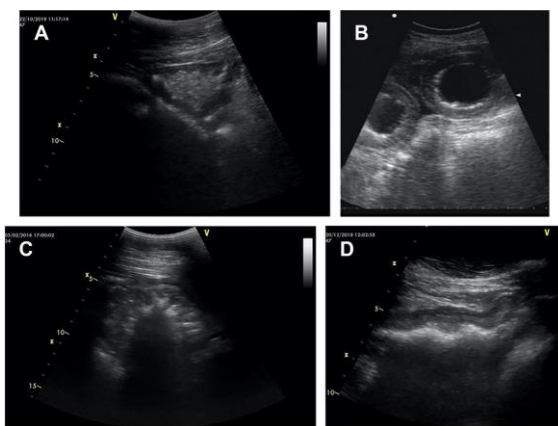
La valutazione iniziale per le presentazioni cliniche di perdita di peso, diarrea e coliche ricorrenti dovrebbe includere l'esclusione di malattie dentali, parassitarie e altre malattie infettive, accumulo di sabbia, insufficienza renale o epatica, disturbi della motilità intestinale e malattie gastriche.⁵² Test specifici per la valutazione di sospetta MII includono la conta delle uova di vermi fecali, la biochimica del siero, il test di assorbimento orale del glucosio o dello xilosio, l'ecografia transaddominale (Figura 5) e transrettale, le biopsie transendoscopiche a spessore parziale della mucosa duodenale e rettale e le biopsie intestinali a tutto spessore ottenute

mediante laparoscopia o laparotomia.^{52,53,58} È stato segnalato che l'aumento della conta delle uova di vermi nelle feci è negativo o ha una bassa prevalenza nei cavalli con diagnosi di MII.^{52,53}

I segni clinico-patologici più comunemente identificati sonoipoproteinemia, ipoalbuminemia e assorbimento anormale di glucosio o xilosio.^{51-53,58} In uno studio è stata segnalata anemia.⁵¹ Nei casi di MEEM è stato riportato un aumento dell'attività sierica della gamma-glutamyl transferasi.⁵¹

L'ispessimento della parete intestinale mediante ecografia transaddominale è stato osservato nel 40-50% dei casi.^{52,53} Le anomalie nelle biopsie transendoscopiche della mucosa duodenale e rettale a spessore parziale sono variabili e probabilmente correlate al tipo di MII e all'estensione della malattia. Anomalie nelle biopsie della mucosa rettale si riscontrano in circa il 40%-50% dei casi (intervallo da 0% a 82%).^{51-53,58} Le biopsie duodenali transendoscopiche non hanno prodotto una diagnosi in uno studio.⁵⁸

Figura 13. Quattro immagini ecografiche ottenute da cavalli con diagnosi di MII, utilizzando biopsie. Tutti mostravano un marcato ispessimento della parete intestinale con cambiamenti nella demarcazione degli strati. (A-D) (in alto a sinistra) Parete duodenale ispessita ricavata dall'11° spazio intercostale destro con diagnosi di enterite linfoplasmocitica da biopsia duodenale transendoscopica. (in alto a destra) Intestino tenue ispessito ottenuto dall'addome caudoventrale destro; un aumento degli eosinofili è stato identificato da una biopsia duodenale transendoscopica. (in basso a sinistra) Colon ventrale destro ispessito ottenuto dall'addome ventrale destro con diagnosi di colite eosinofila da una biopsia a tutto spessore ottenuta durante laparotomia esplorativa. (in basso a destra) Colon ventrale sinistro ispessito ottenuto dall'addome ventrale sinistro con diagnosi di colite linfoplasmocitica da biopsia della mucosa rettale. Barton MH, Hallowell GD. Current Topics in Medical Colic. Vet Clin North Am Equine Pract. 2023 Aug;39(2):229-248. doi: 10.1016/j.cveq.2023.03.008.



Trattamento

Esistono poche prove riguardo alla gestione efficace delle MII nei cavalli. Le raccomandazioni per il trattamento comprendono antiparassitari, corticosteroidi e azatioprina (3-5 mg/kg una volta al giorno).⁵² I cavalli che non rispondevano ai corticosteroidi e richiedevano l'aggiunta di azatioprina hanno avuto risultati peggiori.⁵² Aneddoticamente, cetirizina e oclacitinib, medicinali sintetici. Gli inibitori della cicloesilamino pirrolopirimidina janus chinasi sono stati utilizzati con successo per la gestione della colite eosinofila e delle malattie associate alla MEED ma richiedono ulteriori indagini. A causa della natura multifattoriale delle MII, i casi non sempre rispondono alla stessa gestione; tuttavia, per il trattamento degli esseri umani e dei cani vengono utilizzati

antinfiammatori e antibiotici, ed entrambe le specie di solito richiedono ulteriori interventi per gestire le “riacutizzazioni”.⁶¹ Oltre ai corticosteroidi tradizionali (prednisolone e desametasone), altri agenti che modulano la utilizzati per la risposta infiammatoria e comprendono sulfasalazina, budesonide e ciclosporina. La sulfasalazina (dose canina di 12,5 mg/kg ogni 6 ore per via orale riducendo la frequenza e la dose nel tempo) ha proprietà immunosoppressive, antibatteriche e antinfiammatorie; poiché viene metabolizzato nel suo componente attivo nell'intestino crasso, è probabilmente più utile per le malattie dell'intestino crasso.⁶² Budesonide è considerato un glucocorticoide molto potente che può essere associato a minori effetti collaterali e viene utilizzato nei cani a dosi di 1 o 1.5 mg per via orale una volta al giorno per animali da 3 a 30 kg e superiori a 30 kg, rispettivamente.⁶³ La ciclosporina è un agente immunosoppressore e viene utilizzata nei cani a dosi di 5 mg/kg per via orale una volta al giorno.⁶² Antibiotici comunemente utilizzati per l'MII in i cani che hanno effetti antinfiammatori concomitanti includono metronidazolo e tilosina. Questi antibiotici non solo rimuovono gli organismi patogeni, ma modificano anche il microbiota e riducono la carica batterica commensale che non è tollerata dai cani affetti da MII a causa del loro sistema immunitario gastrointestinale disfunzionale.⁶¹ Altri agenti più recenti utilizzati includono clorambucile e ciclofosfamide, che sono immunosoppressori e immunomodulatori e 2-aminociclati di seconda generazione (mesalazina e olsalazina)⁶²; questi farmaci possono essere usati in combinazione con corticosteroidi o come alternativa.⁶⁴ Attualmente in letteratura esistono prove limitate di benefici consistenti di prebiotici e probiotici.⁶¹ Il trapianto fecale può consentire la manipolazione del microbiota, a breve e medio termine. L'intervento chirurgico per eseguire la resezione e l'anastomosi può essere curativo per l'enterocolite eosinofila idiopatica focale.^{51,65}

Supponendo che la fisiopatologia dell'MII nel cavallo sia simile a quella delle altre specie, semplificare il trattamento e trattare l'MII come se fosse una condizione a breve termine che si risolve con i corticosteroidi probabilmente sarà una scelta inefficace. Occorre infatti apprezzare la natura multifattoriale e tentare di affrontare la causa scatenante e cercare di semplificare la gestione della dieta: cambiare la fonte di fibre, ridurre il contenuto di carboidrati,

semplificare a 1 o 2 fonti di cereali e integrare con olio di mais e vitamine D. Il trattamento chirurgico per resecare lesioni focali può essere utile quando il trattamento medico non ha successo. Le aspettative del cliente devono essere gestite in modo tale da comprendere che si tratta di una condizione cronica e che potrebbe richiedere un trattamento continuo in caso di recidiva.

Assumendo somiglianze con le malattie umane, l'uso di antelmintici e antibiotici nelle prime fasi della vita, l'esposizione a infezioni gastrointestinali e l'allevamento in condizioni molto pulite possono aumentare il rischio di MII in età adulta. In definitiva, mancano studi ampi e multicentrici con diagnosi definitive, anamnesi approfondite e, in ultima analisi, una comprensione della storia naturale delle MII nel cavallo.

3.4 Dislocazione Del Colon

introduzione

La dislocazione del colon grande è il secondo motivo più comune di coliche nei cavalli, dopo l'occlusione del colon, e il secondo motivo più comune per l'invio di coliche.⁶⁶⁻⁶⁸ I due tipi di dislocazione del colon più comunemente descritti sono la dislocazione dorsale del colon ascendente sinistro il legamento nefrosplenico (intrappolamento renosplenico, intrappolamento del legamento nefrosplenico o dislocazione dorsale sinistro del grosso colon, DDSGC) e dislocazione dorsale destro del grosso colon (DDDGC). Sebbene la dislocazione del colon sia spesso citata come la causa più comune di chirurgia delle coliche, il trattamento medico per la dislocazione del colon può spesso essere ottenuto con successo con fluidi enterali, lassativi, restrizione alimentare e analgesici. In alcune condizioni, la trocarizzazione transaddominale o transrettale del cieco o del colon ascendente può alleviare la distensione del gas che contribuisce al dolore e sostiene la dislocazione. In generale, il tasso di sopravvivenza a lungo termine per la dislocazione del colon è eccellente.

Anamnesi e segni clinici

Non esistono fatti storici specifici dei cavalli con DDDGC o DDSGC, sebbene l'DDDGC sia riportato nelle fattrici e l'DDSGC sia riportato più comunemente nei cavalli di taglia grande.^{69,70} I segni clinici del dolore sono variabili e dipendono dal grado di dolore extramurale.

compressione del lume del colon, ritenzione del cibo e distensione gassosa dei segmenti prossimali del colon ascendente e del cieco. I segni clinici delle coliche sono più comunemente acuti, sebbene, in alcuni casi, segni di coliche ricorrenti siano evidenti nei casi con dislocazione cronica. I risultati clinici sono coerenti con un'ostruzione non strangolante e possono includere segni di disidratazione da lieve a moderata in un paziente altrimenti cardiovascolare stabile.^{69,71}

Causa e fisiopatologia

Lo spostamento dorsale sinistro del grosso colon descrive lo scenario clinico in cui il colon sinistro è spostato tra il rene sinistro e la milza e la parete corporea sinistra, dorsalmente al legamento nefrosplenico. L'DDGDC è più facile da descrivere come lo scenario clinico in cui il colon ascendente si muove lateralmente verso la base del cieco in modo tale che una sezione di esso si trovi tra il cieco e la parete corporea destra.⁷² Nella situazione più comune di un DDGDC, l'DDGDC la flessione retroflessa verso l'addome cranioventrale e le flessioni sternale e diaframmatica distese dai gas terminano all'ingresso pelvico.⁷² Meno comunemente, la flessione pelvica attraversa direttamente l'ingresso pelvico e migra lateralmente verso il cieco e la parete corporea destra.⁷² In entrambi gli scenari, una porzione delle flessioni sternale e diaframmatica attraversa l'ingresso pelvico e può essere palpata attraversando l'addome caudale durante l'esame transrettale.

La causa esatta dello spostamento del colon non è nota ed è probabilmente multifattoriale. Lo spostamento è facilitato dal fatto che la flessura pelvica non è fissa nella sua posizione, consentendo un movimento più libero del colon ascendente. La dieta (in particolare quelle ad alto contenuto di carboidrati fermentabili), i cambiamenti nella dieta e nell'esercizio fisico, i cambiamenti nel microbiota fecale e l'ostruzione del colon sono elencati come potenziali cause predisponenti.^{70,72}

Diagnosi

Una diagnosi presuntiva di spostamento del colon può essere ottenuta mediante palpazione transrettale. Nei cavalli con DDSGC, la milza è spesso spostata ventralmente e/o medialmente dalla parete sinistra del corpo e il grosso colon è palpabile nello spazio nefrosplenico. Quest'ultimo reperto può essere difficile da

apprezzare se il colon sinistro presenta una distensione dei gas minima. In un DDDGC, il colon grande disteso dai gas, il più delle volte le flessure sternale e diaframmatica e la tenia coli associata sono palpabili orizzontalmente attraversando l'addome cranialmente all'ingresso pelvico. Il colon spostato rende difficile l'identificazione del cieco. Similmente a un DDSGC, quest'ultimo reperto può essere difficile da apprezzare se non vi è distensione del gas nel colon spostato.

I seguenti reperti ecografici sono stati attribuiti ai cavalli con DDSGC: la parte dorsale della milza o del rene sinistro è obliterata dall'ombra di gas proveniente dal colon sinistro dislocato oppure il colon pieno di liquido è visualizzato nello spazio nefrosplenico. L'incapacità di visualizzare il rene sinistro non è sempre accurata dal punto di vista diagnostico poiché vengono riportate diagnosi sia di falsi positivi che di negativi.⁷³ Il rene sinistro può essere visualizzato ecograficamente nei casi in cui vi è una minima distensione del gas nel colon intrappolato. Più comune di un falso negativo, una diagnosi di falso positivo si riscontra quando è presente gas nel retto dopo un recente esame del retto o quando la distensione del gas del colon sinistro non intrappolato oscura la visualizzazione del rene sinistro.⁷⁴

Nei cavalli con DDDGC, il colon spesso ruota di 180° sul suo asse lungo e i normali vasi del colon localizzati medialmente vengono spostati verso la parete laterale destra del corpo.

Pertanto, nei cavalli sospettati di DDDGC si dovrebbe eseguire un'attenta interrogazione ecografica transaddominale da dorsale a ventrale di ciascuno spazio intercostale destro. L'identificazione dei vasi mesenterici del colon adiacenti alla parete corporea destra in almeno 2 spazi intercostali dorsali alla giunzione costocondrale distinti dai vasi cecali laterali può essere identificata in circa la metà dei cavalli con DDDGC confermato chirurgicamente.⁷⁵ Sebbene la presenza ecografica del dislocato sistema vascolare del colon è altamente associato a DDDGC o volvolo del colon grande a 180°, la sua assenza non esclude lo spostamento. Ness e colleghi hanno trovato quella visualizzazione

dei vasi mesenterici del colon con una specificità dell'89% per DDDGC e sensibilità del 68%, mentre Scharner e colleghi hanno riscontrato una specificità più elevata del 100% ma una sensibilità molto inferiore del 9%.⁷³ In quest'ultimo studio, l'esame trans rettale ecografico aveva una sensibilità sorprendentemente più elevata

(96%). Fatta eccezione per i segni clinico-patologici di disidratazione da lieve a moderata, l'emocromo completo, il profilo chimico del siero e l'analisi del liquido peritoneale dovrebbero rientrare nei limiti normali.⁷¹ In alcuni casi di DDDGC, l'attività della gamma-glutamyl transferasi sierica può essere aumentata, presumibilmente a causa dell'occlusione del il dotto biliare comune dal colon spostato.⁷⁶

Figura 14. Ecografia transaddominale del 12° spazio intercostale destro di un cavallo con DDDGC. La dorsale è a sinistra dell'immagine. La freccia indica i vasi del colon mediale che erano spostati lateralmente rispetto alla parete corporea destra. Barton MH, Hallowell GD. *Current Topics in Medical Colic*. Vet Clin North Am Equine Pract. 2023 Aug;39(2):229-248. doi: 10.1016/j.cveq.2023.03.008.



Trattamento

La prognosi per la sopravvivenza alla dimissione e la sopravvivenza a lungo termine per i cavalli con spostamento del colon è eccellente.^{69,77} I progressi nella gestione medica efficace di DDSGC e DDDGC sono stati positivi nell'ultimo decennio.^{71,78} Nel più ampio studio fino ad oggi che includevano entrambi i tipi di spostamento, la gestione medica ha avuto un buon tasso di successo per il trattamento del sospetto DDDGC (49/77; 64%) e un tasso di successo ancora migliore per i cavalli con sospetto DDSGC (38/50; 76%).⁷¹ Sebbene tutti i casi sono stati esaminati da uno specialista in chirurgia, i casi trattati con terapia medica non sono stati sottoposti a celiotomia esplorativa per confermare una diagnosi definitiva, quindi è possibile che altre cause di semplice ostruzione del grosso colon

siano state erroneamente classificate e il successo della terapia medica sia stato leggermente sopravvalutato.

Per entrambi i tipi di spostamenti, i temi di trattamento comuni includevano l'uso di fluidi enterali ed endovenosi, lassativi enterali, analgesici (alfa-due agonisti, oppioidi, farmaci antinfiammatori non steroidei, agenti antispastici come N-butilscolopammonio bromuro e terapia continua). velocità di infusione di lidocaina), limitazione dell'alimentazione e trocarizzazione cecale o del colon.^{69,71,77,79} La somministrazione di acqua di rubinetto per via rettale a una velocità di mantenimento si è dimostrata efficace nel fornire idratazione ed è ben tollerata, conveniente e sicuro.⁸⁰ I liquidi rettali potrebbero essere considerati un trattamento medico aggiuntivo per i cavalli con spostamento del colon che soffrono di reflusso gastrico e limitazioni finanziarie precludono l'uso di liquidi per via endovenosa. Inoltre, rispetto ai cavalli sani che avevano ricevuto fluidi isotonici per via enterale o endovenosa, i cavalli che avevano ricevuto acqua di rubinetto per via rettale presentavano miglioramenti dei suoni intestinali e una maggiore escrezione fecale.⁸⁰

La trocarizzazione transaddominale o transrettale del cieco o del grosso colon ha guadagnato favore come terapia medica aggiuntiva per le ostruzioni semplici non strangolanti del grosso colon accompagnato da distensione del gas da moderata a grave, con recenti revisioni dettagliate su come eseguire la procedura transaddominale nella fossa paralombare con un catetere di calibro 14.^{81,82} La trocarizzazione riduce la distensione del lume che contribuisce al dolore e ostacola la perfusione. La trocarizzazione può essere un metodo a basso costo per aiutare a gestire il dolore derivante dalla distensione dei gas, sebbene non dovrebbe sostituire l'intervento chirurgico quando accessibile al proprietario e ritenuto necessario per il paziente. Le complicanze sono presumibilmente rare e includono febbre, peritonite, cellulite o formazione di ascessi ed emorragia, ma gli autori di 2 revisioni recenti non hanno riportato complicazioni fatali associate alla trocarizzazione.^{82,83} Trocarizzazioni multiple sono state associate alla mancata sopravvivenza, ma questo è stato attribuito alla gravità della malattia e non al processo di trocarizzazione, poiché il tasso di complicanze non era associato al numero di trocarizzazioni eseguite su un singolo paziente.⁸³

Due ulteriori opzioni di trattamento medico utilizzate specificatamente per DDSGC sono il *jogging* o il rotolamento

strategico sotto anestesia, con o senza trattamento concomitante con fenilefrina, e il trattamento solo con fenilefrina (3 mg/kg/min somministrati in 1 litro di soluzione salina allo 0,9% in 15 minuti). senza fare *jogging* o rotolarsi.^{71,78,79} L'uso della fenilefrina deve essere attentamente considerato nei cavalli anziani. In uno studio, il rischio di sviluppare emorragia associata alla fenilefrina, per lo più fatale, era significativamente più alto nei cavalli di età maggiore o uguale a 15 anni.⁸⁴ Il rischio di emorragia non era associato alla dose di fenilefrina.

È interessante notare che in una recente meta-analisi del 2020 sull'DDSGC in cui 19 studi soddisfacevano i criteri di inclusione, la strategia di trattamento, inclusa la terapia medica rispetto a quella chirurgica, non ha influenzato la probabilità di risoluzione dell'DDSGC.⁷⁹ I pazienti trattati con la tecnica del rotolamento non erano più probabilmente si risolvevano con la gestione medica rispetto a quelli trattati tramite *jogging*, e i pazienti trattati con fenilefrina non avevano maggiori probabilità di mostrare una risoluzione medica rispetto ai pazienti che non avevano ricevuto fenilefrina, né quando venivano considerati tutti i metodi di trattamento medico né quando veniva utilizzato il rotolamento in anestesia generale.⁷⁹ In un unico rapporto pubblicato dopo la meta-analisi, la ricerca di inclusione ha riportato che il 90% dei casi di DDSGC sono stati risolti facendo rotolare il cavallo in anestesia generale.⁷⁸

La sopravvivenza a breve e lungo termine è da buona a eccellente sia per DDRGC che per DDSGC. La recidiva è segnalata con entrambi i tipi di spostamento del colon, sebbene il tasso effettivo di vera recidiva non sia noto. Per i cavalli con DDSGC, è stato riportato che il tasso di recidiva è significativamente più basso nei cavalli sottoposti a chiusura chirurgica dello spazio nefrosplenico assistita da laparoscopia.⁸⁵ Quando si prendono decisioni terapeutiche, potrebbe essere interessante notare che 2 studi retrospettivi hanno rilevato che, rispetto ai cavalli con altre cause di ostruzione non strangolante del grosso colon che richiedevano un intervento chirurgico, i cavalli con DDRGC avevano maggiori probabilità di avere coliche postoperatorie, complicazioni che influivano negativamente sulla sopravvivenza a breve termine e una maggiore probabilità di una nuova laparotomia.^{86,87} Non era possibile per determinare se il trattamento medico avrebbe potuto ridurre il tasso di complicanze

e/o migliorare i risultati a breve termine. Non è stata segnalata alcuna differenza nella sopravvivenza a lungo termine per DDRGC trattato con terapia medica rispetto a quello chirurgico.

Figura 15. Trocarizzazione di un cieco disteso dai gas. È stato utilizzato un catetere calibro 14 collegato a un set di prolunga con l'estremità posizionata in una tazza d'acqua. Nota le bolle di gas nella tazza d'acqua. Barton MH, Hallowell GD. *Current Topics in Medical Colic. Vet Clin North Am Equine Pract.* 2023 Aug;39(2):229-248. doi: 10.1016/j.cveq.2023.03.008.



3.5 Bibliografia

1. Bird AR, Knowles EJ, Sherlock CE, et al. The clinical and pathological features of gastric impaction in twelve horses. *Equine Vet J* 2012;44(S43):105–10.
2. Vainio K, Sykes BW, Blikslager AT. Primary gastric impaction in horses: a retrospective study of 20 cases (2005–2008). *Equine Vet Educ* 2011;23:186–90.
3. Hagedoorn S, Witt P, Kranenburg LC, et al. The use of cola for the treatment of gastric impactions in horses. *Equine Vet Ed* 2021;33:38.
4. Tallon R, Hayes C, Dunkel K. Comparison of outcomes for lone and concurrent gastric impactions in 113 hospitalized horses. *Equine Vet J* 2020;52:5.
5. McGovern KF, Suthers JM, James FM, et al. Gastric impaction associated with displacement and volvulus of the large colon in seven mature horses. *Equine Vet Educ* 2015;27:453–9.
6. Giusto G, Cerullo A, Gandini M. Gastric and Large Colon Impactions Combined With Aggressive Enteral Fluid Therapy May Predispose to Large Colon Volvulus: 4 Cases. *J Equine Vet Sci* 2021;102:103617.
7. Hurtado IR, Stewart A, Pellegrini-Masini A. Successful treatment for a gastric persimmon bezoar in a pony using nasogastric lavage with a carbonated cola soft drink. *Equine Vet Educ* 2007;19:571–4.
8. Banse HE, Gilliam LL, House AM, et al. Gastric and enteric phytobezoars caused by ingestion of persimmon in equids. *J Am Vet Med Assoc* 2011;239:1110–6.
9. Banse HE. Management of phytobezoars. *Equine Vet Educ* 2020;32:515–7.
10. Iwamuro M, Yamauchi K, Shiraha H, et al. All carbonated beverages effectively dissolve phytobezoars. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2018;42:e66–7.
11. Parker RA, Barr ED, Dixon PM. Treatment of equine gastric impaction by gastro- tomy. *Equine Vet Educ* 2011;23:169–73.
12. Bauck AG, Nelson E, McLain A, et al. J-incision to approach the cranial abdomen in the adult horse. *Vet Surg* 2021;50:600–6.
13. Rendle D, Bowen M, Brazil T, et al. Recommendations for the management of equine glandular gastric disease. *UK-Vet Equine*. 2018;2:2–11.
14. Sykes B, Bowen M, Habershon-Butcher J, et al. Management factors and clinical implications of glandular and squamous gastric disease in horses. *J Vet Intern Med* 2019;33:233–40.
15. Sykes BW, Sykes KM, Hallowell GD. A comparison of two doses of omeprazole in the treatment of equine gastric ulcer syndrome: A blinded, randomised, clinical trial. *Equine Vet J* 2014;46:416–21.
16. Sykes BW, Sykes KM, Hallowell GD. A comparison of three doses of omeprazole in the treatment of equine gastric ulcer syndrome: A blinded, randomised, dose- response clinical trial. *Equine Vet J* 2015;47:285.
17. deLaHunta A, Glass E, Kent M. *Veterinary neuroanatomy and clinical neurology*. 4th edition. St. Louis, MO: Elsevier; 2014.
18. Begg LM, O'Sullivan CB. The prevalence and distribution of gastric ulceration in 345 racehorses. *Aust Vet J* 2003;81:199–201.
19. Husted L, Jensen TK, Olsen SN, et al. Examination of equine glandular stomach lesions for bacteria, including *Helicobacter* spp by fluorescence in situ hybridisa- tion. *BMC Microbiol* 2010;10. Article number 84.
20. Luthersson N, Nielsen KH, Harris P, et al. The prevalence and anatomical distri- bution of equine gastric ulceration syndrome (EGUS) in 201 horses in Denmark. *Equine Vet J* 2009;41:619–24.

21. Martineau H, Thompson H, Taylor D. Pathology of gastritis and gastric ulceration in the horse. Part 1: Range of lesions present in 21 mature individuals. *Equine Vet J* 2009;41:638–44.
22. Nieto JE, Snyder JR, Beldomenico P, et al. Prevalence of gastric ulcers in endurance horses - a preliminary report. *Vet J* 2004;167:33–7.
23. Tamzali Y, Marguet C, Priymenko N, et al. Prevalence of gastric ulcer syndrome in high-level endurance horses. *Equine Vet J* 2011;43:141–4.
24. Moñiki J, Hewetson M, Virtala AMK. Risk factors for equine gastric glandular disease: a case-control study in a Finnish referral hospital population. *J Vet Intern Med* 2016;30:1270–5.
25. Pedersen SK, Cribb AE, Windeyer MC, et al. Risk factors for equine glandular and squamous gastric disease in show jumping Warmbloods. *Equine Vet J* 2018;50:747.
26. Banse HE, MacLeod H, Crosby C, et al. Prevalence of and risk factors for equine glandular and squamous gastric disease in polo horses. *Can Vet J* 2018;59: 880–4.
27. Malmkvist J, Poulsen JM, Luthersson N, et al. Behaviour and stress responses in horses with gastric ulceration. *Appl Anim Behav Sci* 2012;142:160–7.
28. Scheidegger MD, Gerber V, Bruckmaier RM, et al. Increased adrenocortical response to adrenocorticotrophic hormone (ACTH) in sport horses with equine glandular gastric disease (EGGD). *Vet J* 2017;228:7–12.
29. Scott L, de Lavis I, Daniels S. Crib Biting and Equine Gastric Ulcer Syndrome, is there an Anatomical link? *Equine Vet Educ* 2017;S8:11.
30. MacLeod H, Windeyer C, Crosby C, et al. Prevalence and risk factors for gastric ulceration in polo horses. *J Vet Intern Med* 2015;27:1244.
31. Cayado P, Muñoz-Escassi B, Domínguez C, et al. Hormone response to training and competition in athletic horses. *Equine Vet J* 2006;274–8.
32. Covallesky ME, Russoniello CR, Malinowski K. Effects of show-jumping performance stress on plasma cortisol and lactate concentrations and heart rate and behavior in horses. *J Equine Vet Sci* 1992;12:244–51.
33. Crumpton SM, Baiker K, Hollowell GD, et al. Diagnostic Value of Gastric Mucosal Biopsies in Horses with Glandular Disease. *Equine Vet J* 2015;47:9.
34. Merritt AM, Sanchez LC, Burrow JA, et al. Effect of GastroGard and three compounded oral omeprazole preparations on 24 h intragastric pH in gastrically cannulated mature horses. *Equine Vet J* 2003;35:691–5.
35. Hepburn R. Equine Glandular Ulceration: Epidemiology and Pathophysiology. Proceedings of the Annual Veterinary Medical Forum - American College of Veterinary Internal Medicine, New Orleans. 2012;289–289.
36. Muñoz-Prieto A, Contreras-Aguilar MD, Ceroñ JJ, et al. Changes in Proteins in Saliva and Serum in Equine Gastric Ulcer Syndrome Using a Proteomic Approach. *Animals* 2022;12:1169–83.
37. Sykes BW, Hewetson M, Hepburn RJ, et al. European College of Equine Internal Medicine Consensus Statement—Equine Gastric Ulcer Syndrome in Adult Horses. *J Vet Intern Med* 2015;29:1288–99.
38. Gough S, Hollowell GD, Rendle D. A study investigating the treatment of equine squamous gastric disease with long-acting injectable or oral omeprazole. *Vet Med Sci* 2020;6:235–41.
39. Tallon R, Hewetson M. Inter-observer variability of two grading systems for equine glandular gastric disease. *Equine Vet J* 2021;49:502.
40. Pratt S, Bowen I, Hollowell G, et al. Assessment of agreement using the

equine glandular gastric disease grading system in 84 cases. *Vet Med Sci* 2022;8: 1472–7.

41. Paul C, Ericsson C, Andrews F, et al. Gastric microbiome in horses with and without equine glandular gastric disease. *J Vet Intern Med* 2021;35:2458–64.
42. Voss SJ, McGuinness DH, Weir W, et al. A study comparing the healthy and diseased equine glandular gastric microbiota sampled with sheathed transendoscopic cytology brushes. *J Equine Vet Sci* 2022;116:104002.
43. Varley G, Bowen IM, Habershon-Butcher JL, et al. Misoprostol is superior to combined omeprazole-sucralfate for the treatment of equine gastric glandular disease. *Equine Vet J* 2019;51:575–80.
44. Sangiah S, MacAllister C, Amouzadeh H. Effects of misoprostol and omeprazole on basal gastric pH and free acid content in horses. *Res Vet Sci* 1989;47:350–4.
45. Martin EM, Schirmer JM, Jones SL, et al. Pharmacokinetics and ex vivo anti-inflammatory effects of oral misoprostol in horses. *Equine Vet J* 2019;51:415–21.
46. Jacobson CC, Sertich PL, McDonnell SM. Mid-gestation pregnancy is not disrupted by a 5-day gastrointestinal mucosal cytoprotectant oral regimen of misoprostol. *Equine Vet J* 2013;45:91–3.
47. Sykes BW, Kathawala K, Song Y, et al. Preliminary investigations into a novel, long-acting, injectable, intramuscular formulation of omeprazole in the horse. *Equine Vet J* 2017;49:795–801.
48. Gough S, Hallowell G, Rendle D. Evaluation of the treatment of equine glandular gastric disease with either long-acting-injectable or oral omeprazole. *Vet Med Sci* 2022;561-567.
49. Cargile JL, Burrow JA, Kim I, et al. Effect of dietary corn oil supplementation on equine gastric fluid acid, sodium, and prostaglandin E2 content before and during pentagastrin infusion. *J Vet Intern Med* 2004;18:545–9.
50. Sykes BW, Sykes KM, Hallowell GD. Efficacy of a combination of apoeptol, live yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), and magnesium hydroxide in the management of equine gastric ulcer syndrome in thoroughbred racehorses: a blinded, randomized, placebo-controlled clinical trial. *J Equine Vet Sci* 2014;34:1274–8.
51. Schumacher J, Edwards JF, Cohen ND. Chronic idiopathic inflammatory bowel diseases of the horse. *J Vet Intern Med* 2000;14:258–65.
52. Kaikkonen R, Niinistö K, Sykes B, et al. Diagnostic evaluation and short-term outcome as indicators of long-term prognosis in horses with findings suggestive of inflammatory bowel disease treated with corticosteroids and anthelmintics. *Acta Vet Scand* 2014;56:35.
53. Kemper DL, Perkins GA, Schumacher J, et al. Equine lymphocytic-plasmacytic enterocolitis: a retrospective study of 14 cases. *Equine Vet J* 2000;108–12.
54. Ponder A, Long MD. A clinical review of recent findings in the epidemiology of inflammatory bowel disease. *Clin Epidemiol* 2013;2013:237–47.
55. Denson LA, Long MD, McGovern DPB, et al. Challenges in IBD Research: Update on Progress and Prioritization of the CCFA's Research Agenda. *Inflamm Bowel Dis* 2013;19:677–82.
56. Sartor RB. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. United States: Elsevier Science BV Amsterdam; 2008. p. 577–94.
57. van der Kolk JH, van Putten LA, Mulder CJ, et al. Gluten-dependent antibodies in horses with inflammatory small bowel disease (ISBD). *Vet Q*

2012;32:3–11.

58. Metcalfe LVA, More SJ, Duggan V, et al. A retrospective study of horses investi- gated for weight loss despite a good appetite (2002-2011). *Equine Vet J* 2013;45: 340–5.
59. Jacobs G, Collins-Kelly L, Lappin M, et al. Lymphocytic-plasmacytic enteritis in 24 dogs. *J Vet Intern Med* 1990;4:45–53.
60. Salem PA, Nassar VH, Shahid MJ, et al. Mediterranean abdominal lymphoma," or immunoproliferative small intestinal disease. Part I: clinical aspects. *Cancer* 1977; 40:2941–7.
61. Jergens AE, Simpson KW. Inflammatory bowel disease in veterinary medicine. *Front Biosci (Elite Ed)* 2012;4:1404–19.
62. Malewska K, Rychlik A, Nieradka R, et al. Treatment of inflammatory bowel dis- ease (IBD) in dogs and cats. *Pol J Vet Sci* 2011;14:165–71.
63. Dye TL, Diehl KJ, Wheeler SL, et al. Randomized, Controlled Trial of Budesonide and Prednisone for the Treatment of Idiopathic Inflammatory Bowel Disease in Dogs. *J Vet Intern Med* 2013;27:1385–91.
64. Va'zquez-Baeza Y, Hyde ER, Suchodolski JS, et al. Dog and human inflammatory bowel disease rely on overlapping yet distinct dysbiosis networks. *Nature micro- biology* 2016;1. Article number 16177.
65. Edwards GB, Kelly DF, Proudman CJ. Segmental eosinophilic colitis: a review of 22 cases. *Equine Vet J* 2000;(Supplement):86–93.
66. Abutarbush SM, Carmalt JL, Shoemaker RW. Causes of gastrointestinal colic in horses in western Canada: 604 cases (1992 to 2002). *Can Vet J* 2005;46:800–5.
67. Gunes V, Onmaz AC, Pavaloiu A, et al. A retrospective study of gastrointestinal disorders in a predominantly Austrian leisure horse referral hospital population. *Equine Vet Educ* 2022;34:467–72.
68. Voigt A, Saulez MN, Donnellan CM, et al. Causes of gastrointestinal colic at an equine referral hospital in South Africa (1998-2007). *J S Afr Vet Assoc* 2009;80: 192–8.
69. Pilorge G, Battail G, Gluntz X, et al. Retrospective study of 75 cases of left dorsal colon displacement in horses. *Prat Vet Equine* 2002;34:25–35.
70. Weese JS, Holcombe SJ, Embertson RM, et al. Changes in the faecal microbiota of mares precede the development of post partum colic. *Equine Vet J* 2015;47: 641–9.
71. McGovern KF, Bladon BM, Fraser BSL, et al. Attempted medical management of suspected ascending colon displacement in horses. *Vet Surg* 2012;41:399–403.
72. Southwood L. Large colon. In: Auer J, Stick J, Kummerle J, et al, editors. *Equine surgery*. 5th edition. St. Louis, MO: Elsevier; 2019. p. 591–621.
73. Cribb NC, Arroyo LG. Techniques and Accuracy of Abdominal Ultrasound in Gastrointestinal Diseases of Horses and Foals. *Vet Clin N Am Equine Pract* 2018;34:25–38.
74. Beccati F, Pepe M, Gialletti R, et al. Is there a statistical correlation between ultra- sonographic findings and definitive diagnosis in horses with acute abdominal pain? *Equine Vet J Suppl* 2011;98-105.
75. Grenager NS, Durham MG. Ultrasonographic evidence of colonic mesenteric vessels as an indicator of right dorsal displacement of the large colon in 13 hors- es. *Equine Vet J* 2011;43:153–5.
76. Gardner RB, Nydam DV, Mohammed HO, et al. Serum gamma glutamyl trans- ferase activity in horses with right or left dorsal displacements of the large

- colon. *J Vet Intern Med* 2005;19:761–4.
77. Monreal L, Navarro M, Armengou L, et al. Enteral fluid therapy in 108 horses with large colon impactions and dorsal displacements. *Vet Rec* 2010;166:259–63.
 78. Normand T, Santinelli Y, Carette O, et al. Sixty-eight cases of nephrosplenic attachment treated by rolling under general anaesthesia. *Prat Vet Equine* 2018; 50:46–51.
 79. Gillen A, Kottwitz J, Munsterman A. Meta-analysis of the Effect of Treatment Strategies for Nephrosplenic Entrapment of the Large Colon. *J Equine Vet Sci* 2020; 92:103169.
 80. Khan A, Hallowell GD, Underwood C, et al. Continuous fluid infusion per rectum compared with intravenous and nasogastric fluid administration in horses. *Equine Vet J* 2019;51:767–73.
 81. Schroeder EL, Gardner AK, Mudge MC. How to perform a percutaneous cecal or colonic trocarization in horses with severe abdominal tympany. *Vet Emerg Crit Care* 2022;32:57–62.
 82. Tadros E. How to perform percutaneous cecal and colonic trocharization in horses with gastrointestinal colic. American Association of Equine Practitioners 61st Annual Conference, December 5-9, 2015, Las Vegas, NV, 2015;169–172.
 83. Schoster A, Torgerson PR, Bischofberger AS, et al. Outcome and complications following transrectal and transabdominal large intestinal trocarization in equids with colic: 228 cases (2004-2015). *J Am Vet Med Assoc* 2020;257:189–95.
 84. Frederick J, Giguère S, Butterworth K, et al.: Severe phenylephrine-associated hemorrhage in five aged horses. *J Am Vet Med Assoc* 2010;237:830-834.
 85. Arevalo Rodríguez JM, Grulke S, Salciccia A, et al. Nephrosplenic space closure significantly decreases recurrent colic in horses: a retrospective analysis. *Vet Rec* 2019;185:657–63.
 86. Smith LJ, Mair TS. Are horses that undergo an exploratory laparotomy for correction of a right dorsal displacement of the large colon predisposed to postoperative colic, compared to other forms of large colon displacement? *Equine Vet J* 2010;42:44–6.
 87. Whyard J, Brounts S. Post-Operative Complications And Survival In Horses With Right Dorsal Displacement Of The Ascending Colon Compared With Other Non-Strangulating Ascending Colon Lesions. *Equine Vet Educ* 2017;29:31.

3 COLICHE DA COSTIPAZIONE

Spesso si ritiene che le ostruzioni dell'intestino tenue e crasso siano la causa delle coliche nei cavalli. Un'occlusione è un accumulo di cibo disidratato in una porzione del tratto digestivo. Più comunemente, il termine "occlusione" viene utilizzato quando si parla di questa condizione del colon ascendente (grande); tuttavia, le ostruzioni possono verificarsi anche in altri segmenti dell'intestino. Le occlusioni causano semplici ostruzioni del tratto intestinale e generalmente non causano ischemia o necrosi dell'intestino a meno che non diventino gravi.¹

Le occlusioni si trovano tipicamente nei siti in cui il diametro intestinale diminuisce. Questi siti includono la flessura pelvica (la transizione dal colon ventrale sinistro al colon dorsale sinistro) e la transizione dal colon dorsale destro al colon trasverso. Inoltre, possono verificarsi occlusioni in siti che contengono sfinteri, come l'orifizio ileale-cecale-colico. La patogenesi specifica delle occlusioni non è completamente compresa, sebbene siano stati identificati fattori di rischio per diversi tipi di occlusioni. L'esordio clinico per la maggior parte delle ostruzioni è più lento di quello osservato nelle lesioni da strangolamento e i proprietari di cavalli possono notare segni clinici lievi per un lungo periodo di tempo.¹

Il trattamento di tipi specifici di occlusioni verrà discusso più avanti, ma in generale prevede la sospensione del cibo fino al passaggio dell'occlusione, la reidratazione dell'ingesta e, se necessario, la somministrazione di agenti analgesici. Nei casi più gravi, può essere necessario un intervento chirurgico per alleviare l'ostruzione. Inizialmente, come con qualsiasi tipo di colica, l'alimentazione dovrebbe essere sospesa non appena la condizione viene riconosciuta. Poiché il dolore addominale associato a queste condizioni è spesso lieve, i cavalli continueranno a mangiare. Inoltre, prima di reintrodurre il mangime in un cavallo con ostruzione, la condizione patologica dovrebbe essere risolta e ciò dovrebbe essere confermata, più comunemente eseguendo un esame rettale ripetuto (con costipazione a livello della flessione pelvica) o attraverso l'osservazione del transito di un volume adeguato di feci.¹

L'uso di analgesici è necessario per ridurre il dolore e gli spasmi intestinali che si verificano nei siti di occlusione. Il controllo del dolore per i cavalli con ostruzioni è relativamente semplice rispetto a quello

per i cavalli con coliche più gravi e spesso richiede interventi terapeutici minori e somministrazione meno frequente di farmaci per ottenere il controllo del dolore. Flunixin meglumine (0,5–1,1 mg/kg/12 ore, IV) è un farmaco antinfiammatorio non steroideo considerato uno dei migliori analgesici per il dolore colico (viscerale); tuttavia, il fenilbutazone (4,4 mg/kg, IV) può essere altrettanto efficace in alcuni cavalli. Agenti come flunixin meglumine e fenilbutazone inibiscono la produzione di cicloossigenasi, che a sua volta impedisce la formazione di prostaglandina, che è attiva nel causare aumento del flusso sanguigno, irritazione e infiammazione. Se la flunixin meglumine da sola non è sufficiente a controllare il dolore, soprattutto nei cavalli in cui è presente distensione gastrointestinale, la xilazina è il farmaco di scelta. La xilazina è un depressore del sistema nervoso e un agonista adrenergico alfa-2. Ha effetti sui recettori presinaptici e postsinaptici del sistema nervoso centrale e periferico e queste azioni riducono gli spasmi intestinali. Fornisce analgesia e sedazione ai cavalli con ostruzioni. Generalmente, la xilazina (0,1-0,2 mg/kg, EV; 0,2-0,3 mg/kg, IM) può essere utilizzata per fornire analgesia e sedazione; tuttavia, dosi più piccole o più grandi potrebbero essere utilizzate per i cavalli con dolore variabile. Fornisce brevi periodi (15-120 minuti) di sollievo dal dolore.¹

La detomidina (2,5-5,0 mg/kg, EV o IM), un agonista alfa-2 più potente della xilazina, può essere utilizzata con giudizio per fornire analgesia; tuttavia, questo potente analgesico può mascherare un forte dolore. Ogni volta che si utilizza la detomidina, il cavallo deve essere monitorato frequentemente, prestando attenzione anche al colore della mucosa, al tempo di riempimento capillare o ad altre gravi degradazioni dei parametri clinici. Gli oppioidi (p. es., butorfanolo, 0,01-0,02 mg/kg, EV o IM) possono essere utilizzati in combinazione con alfa-2 agonisti per fornire neuroleptanalgesia. È noto che gli oppioidi bloccano la motilità del colon e quindi forniscono un sollievo temporaneo dal dolore.¹

Gli spasmolitici sono stati utilizzati per fornire analgesia diminuendo gli spasmi in numerose specie, compresi i cavalli che presentano episodi di coliche. Il bromuro di N-butilscopolammonio (Buscopan, Boehringer Ingelheim, GmbH, Germania; 0,3 mg/kg, IV, lentamente) è approvato per l'uso nei cavalli negli Stati Uniti. Questo agente è un agente antimuscarinico e anticolinergico utilizzato

specificamente come antispasmodico. Quando viene utilizzato, è importante non somministrare un sovradosaggio o utilizzare il farmaco per un periodo di tempo prolungato perché può causare ileo prolungato. Inoltre, è noto che questo farmaco aumenta la frequenza cardiaca per circa 30 minuti dopo la somministrazione; quindi, la frequenza cardiaca non può essere utilizzata come indicatore accurato dell'aumento del dolore durante questo periodo. La fluidoterapia (enterale o parenterale) deve essere somministrata con l'obiettivo della reidratazione sistemica e dell'idratazione delle parti ingerite per consentire la risoluzione dell'occlusione. La somministrazione enterale di liquidi verrà discussa in maggior dettaglio più avanti. L'obiettivo della terapia fluida endovenosa bilanciata è diminuire la concentrazione delle proteine plasmatiche (cioè, l'iperidratazione) e produrre un aumento della secrezione intestinale nelle aree dell'occlusione. Per ottenere ciò, è necessario utilizzare una velocità di fluido compresa tra circa 120 e 240 ml/kg/giorno (2-4 volte la velocità di fluido di mantenimento). Quando si somministrano liquidi per via endovenosa a queste velocità, è importante monitorare le concentrazioni di elettroliti (sodio, potassio e cloruro). I lassativi sono usati per risolvere l'occlusione e quelli comunemente usati includono olio minerale, solfato di magnesio, diottil sodio solfosuccinato e psillio. L'olio minerale (5-10 ml/kg, tramite sondino nasogastrico) potrebbe non penetrare nella massa del cibo solido, così come alcuni altri lassativi. L'olio minerale è utile come indicatore del tempo di transito intestinale e dovrebbe essere evidente come colorazione sull'area perineale per 12-18 ore dopo la somministrazione. Solfato di magnesio (1 g/kg, in 2 litri di acqua, tramite sondino nasogastrico, ogni 12-24 ore), ha un effetto catartico osmotico e favorisce lo spostamento dell'acqua nel lume intestinale, ammorbidendo così l'occlusione. È importante che il cavallo sia idratato a livello sistemico quando si utilizza solfato di magnesio, poiché è stata segnalata tossicità nei cavalli disidratati.¹

Storicamente alcuni sostengono che il diottil sodio solfosuccinato (DSS; da 16,5 a 66 mg/kg, miscelato in 1 litro di acqua, tramite sondino nasogastrico) sia utile nel trattamento delle ostruzioni. Essendo un tensioattivo anionico, facilita la penetrazione dell'acqua nelle parti ingerite solide diminuendo la tensione superficiale. Sono stati segnalati casi di sovradosaggio e il margine di sicurezza con

questo farmaco è basso. È stata segnalata una dose massima di 0,2 g/kg, ma un rapporto ha suggerito che sono stati osservati segni tossici in un cavallo normale a cui erano stati somministrati 50 mg/kg tramite un sondino nasogastrico.^{2,3} Non esistono studi recenti che ne valutino l'efficacia. o uso clinico del DSS, quindi deve essere usato con cautela nei cavalli che presentano coliche da impatto.

Sebbene la maggior parte delle occlusioni possa essere gestita dal punto di vista medico, nelle occlusioni più gravi è necessario il trattamento chirurgico. Generalmente, l'intervento chirurgico è necessario nei cavalli che presentano dolore incontrollato o per quelli che non rispondono alla terapia medica.

3.1 Costipazione Duodenale e Digiunale

Le occlusioni del duodeno e del digiuno sono rare e le segnalazioni in letteratura sono limitate a pochi casi clinici. Sono state segnalate occlusioni duodenali causate dall'ingestione di mais spezzato, pannocchie, legno, fitobezoari, tricotifobezoari e frutto di cachi.⁴⁻⁹ I segni clinici delle occlusioni duodenali sono simili a quelli di altre occlusioni duodenali. ostruzioni e i cavalli spesso presentano un reflusso nasogastrico significativo. La diagnosi delle occlusioni duodenali viene solitamente effettuata durante un intervento chirurgico o un'autopsia e il trattamento avviene caso per caso, a seconda della natura dell'occlusione.

Le ostruzioni digiunali primarie con alimentazione sono rare. Le ostruzioni digiunali sono tipicamente secondarie ad aderenze intestinali, ischemia o diverticolo. La diagnosi si basa sui segni clinici di colica e sull'evidenza di un'ostruzione dell'intestino tenue (cioè, eccessivo reflusso nasogastrico). Spesso è necessario un intervento chirurgico per trattare la causa scatenante primaria.

3.2 Costipazione Ileale

L'occlusione ileale è una delle principali cause di ostruzione non strangolante del piccolo intestino nei cavalli. L'alimentazione con fieno di gramigna è stata identificata come un fattore di rischio per le occlusioni ileali nei cavalli.¹⁰ Inoltre, i cambiamenti nell'alimentazione del fieno (ad esempio, l'introduzione di una palla rotonda al pascolo) sono stati identificati come fattori di rischio per lo sviluppo della patologia. Inoltre, è stato dimostrato che l'infezione causata dalla tenia intestinale *Anaplocephala perfoliata* ha una forte associazione

con le occlusioni ileali nei cavalli del Regno Unito.¹¹ Un studio ha riscontrato un tasso significativamente più elevato di occlusioni ileali in autunno (settembre-novembre), mentre altri non hanno individuato alcuna distribuzione stagionale.¹²

I cavalli con ostruzioni ileali mostrano segni compatibili con un'ostruzione dell'intestino tenue con abbondante reflusso nasogastrico. Differenziare un'occlusione ileale da una lesione strangolante dell'intestino tenue o da un'enterite anteriore può essere difficile. Il dolore addominale varia da lieve a grave, a seconda della durata dell'ostruzione e del grado di distensione intestinale e gastrica.^{10,12,13} La maggior parte dei cavalli presenta una diminuzione dei borborigmi gastrointestinali e un aumento della frequenza cardiaca.^{10,12,13} Il reflusso nasogastrico è comunemente ottenuto, ma può essere assente se l'occlusione è stata presente per un breve periodo di tempo.^{10,12,13} Un esame rettale eseguito nelle prime fasi dell'occlusione può consentire all'esaminatore di palpare una massa pastosa sul lato destro dell'addome appena medialmente al cieco.¹⁴ Più comunemente, la distensione dell'intestino tenue è così grave che non è possibile palpare l'occlusione.^{10,12,13} L'esame del liquido peritoneale può essere utile per determinare se l'intestino tenue è ischemico e compromesso (sia se associato all'occlusione se sia presente una lesione strangolante). I campioni di liquido peritoneale nei cavalli con ostruzioni ileali sono generalmente di colore giallo chiaro e presentano una conta leucocitaria normale (<10.000 cellule/ml) e una concentrazione di proteine totali da normale a leggermente elevata (< 3 gm/dL).^{10,12}

Storicamente, il trattamento chirurgico per le occlusioni ileali veniva suggerito sulla base di uno studio che riportava tassi di sopravvivenza più elevati per i cavalli sottoposti a intervento chirurgico prima della comparsa dei segni clinici.¹³ Più recentemente, sono stati segnalati trattamenti medici efficaci per cavalli con occlusioni ileali che avevano uno stato cardiovascolare stabile e rispondevano ai farmaci antidolorifici.¹⁴ Come discusso in precedenza in questo articolo, la distinzione tra un'occlusione ileale e un'ostruzione strangolante può essere difficile. Se la diagnosi non è chiara, l'intervento chirurgico precoce può aumentare il tasso di sopravvivenza dei cavalli che hanno un decorso prolungato della malattia.

La terapia medica per le occlusioni ileali prevede la reidratazione endovenosa utilizzando fluidi poli-ionici bilanciati a una velocità pari a due o tre volte la velocità di mantenimento (120-180 ml/kg/giorno), l'uso di metodi di controllo del dolore ed esami seriali della gravità della distensione dell'intestino tenue e del liquido peritoneale campioni. A differenza di altre ostruzioni più distali, la decompressione dello stomaco raccogliendo il reflusso nasogastrico è fondamentale nel trattamento delle ostruzioni ileali e l'uso di fluidi orali o altri farmaci dovrebbe essere evitato. È importante valutare la risposta ai metodi di riduzione del dolore nei cavalli con reflusso nasogastrico continuo. Il dolore continuo dopo la decompressione dello stomaco può indicare una malattia più grave dell'intestino tenue.

Il trattamento chirurgico dovrebbe essere effettuato quando i cavalli non rispondono alla terapia medica e agli antidolorifici o ai cambiamenti nel liquido peritoneale dei globuli bianchi e nella concentrazione delle proteine totali, che potrebbero suggerire che l'intestino è compromesso. Ammorbidendo l'occlusione attraverso il massaggio extra-luminale con fluido nell'intestino nel percorso intestinale verso l'occlusione, l'occlusione può anche essere ridotta manualmente durante l'intervento chirurgico.^{12,13} Alcuni autori sostengono l'iniezione di una soluzione salina e DSS (soluzione orale contenente 1,5 L soluzione salina con 60 ml di DSS) nell'occlusione utilizzando un ago calibro 18 per ridurre al minimo il trauma all'intestino se l'occlusione non viene ridotta facilmente.¹² Storicamente, le procedure di *bypass* compreso il quello digiuno-cecale con o senza resezione ileale venivano consigliate come parte del procedimento di correzione chirurgica.¹³ A causa delle numerose complicazioni e degli alti tassi di successo del massaggio extramurale senza procedura di *bypass*, tali procedure non vengono più eseguite a meno che l'intestino non sia compromesso o vi sia ipertrofia ileale.¹²

I cavalli con occlusioni ileali hanno una buona prognosi purché vengano trattati precocemente. Parks e colleghi,¹³ in uno studio retrospettivo su 75 cavalli, hanno riscontrato che la sopravvivenza diminuiva con l'aumentare della durata dei segni clinici. La maggior parte dei cavalli in questo studio erano stati sottoposti a intervento chirurgico con enterotomia o procedura di *bypass*. I cavalli possono essere trattati con successo dal punto di vista medico, a condizione

che abbiano uno stato cardiovascolare stabile, dolore controllabile, risoluzione della distensione dell'intestino tenue all'esame rettale e nessuna evidenza di cambiamenti significativi nel liquido peritoneale.

3.3 Costipazione del Cieco

L'occlusione del cieco è la condizione patologica più comune che colpisce il cieco, rappresentando il 5% dei cavalli osservati con occlusione intestinale e fino al 4,1% dei cavalli osservati nelle cliniche per cavalli.^{15,16} L'incidenza della rottura del cieco nei cavalli con costipazione dello stesso possono raggiungere il 57%.¹⁷ Le occlusioni cecali sono state classificate in due tipi: occlusioni cecali dovute alla presenza di alimento disidratato e disfunzione cecale dovuta alla presenza di liquido e alimento disidratato.¹⁸

La patogenesi dell'occlusione cecale è probabilmente multifattoriale e la causa specifica di ogni singolo caso è solitamente sconosciuta. Esistono segnalazioni aneddotiche di occlusioni cecali associate a scarsa dentatura, ridotta assunzione di acqua, alimentazione con foraggi grossolani, somministrazione di farmaci antinfiammatori non steroidei e infestazione da *A. perfoliata*.^{17,19,20} Cavalli ricoverati in ospedale per malattie non correlate al tratto gastrointestinale, prevalentemente quelli di origine muscoloscheletrica, sono stati identificati affetti da ostruzioni cecali.¹⁷ Oggi, la maggior parte di questi cavalli viene posta in anestesia generale e riceve farmaci antinfiammatori non steroidei. Si ritiene che in questi casi le anomalie della motilità cecale, al contrario dell'ostruzione meccanica causata da alimenti solidi e duri, siano la causa principale dell'occlusione. Uno studio ha rilevato che i cavalli arabi, appaloosa e morgan presentano un rischio maggiore di occlusione cecale, mentre altri studi non hanno riscontrato razze specifiche a rischio aumentato.^{15,17,20,21} Diversi studi hanno riscontrato che i cavalli più anziani (>15 anni) corrono un rischio maggiore di sviluppare questo tipo di problema.^{15,20,21}

Tipicamente, i cavalli con ostruzioni del cieco mostrano segni di colica da lievi a moderati e i segni di dolore possono continuare per diversi giorni.^{15,17,21-23} In alternativa, in alcuni cavalli la condizione progredisce rapidamente e il cieco potrebbe rompersi prima di che un trattamento adeguato possa avere luogo.^{15,17,21} In uno studio recente su 114 cavalli trattati per occlusioni cecali, la frequenza cardiaca mediana era di 46 battiti al minuto e il tempo medio di riempimento

capillare era di 2 secondi. La maggior parte dei risultati clinici di laboratorio non erano significativamente diversi dai valori normali e l'evidenza di disidratazione sistemica rappresentava l'anomalia più consistente. La maggior parte dei cavalli con ostruzioni cecali non presentava alcun reflusso nasogastrico netto. I parametri del liquido peritoneale sono solitamente entro limiti normali, a meno che l'occlusione non sia diventata così grave da compromettere la parete intestinale, il che potrebbe essere il risultato di necrosi da compressione.¹⁵ Pertanto, i risultati di questi e altri studi evidenziano che questo tipo di occlusioni causano lievi cambiamenti come si è visto dall'esame fisico e dai test di laboratorio e che un'attenta palpazione rettale è fondamentale nella diagnosi. Secondo quanto riferito, la prima anomalia avvertita durante un esame rettale è un aumento della tensione sulla banda cecale ventrale.²⁰ Può essere difficile differenziare i cavalli con distensione cecale dai cavalli con distensione del colon estesa. Per facilitare la diagnosi di occlusione cecale, è importante ricordare che il cieco è attaccato alla parete dorsale del corpo e pertanto non è possibile passare una mano dorsalmente su un cieco disteso.

Il trattamento delle inclusioni cecali è controverso, alcuni Medici prediligono la terapia medica altri l'intervento chirurgico.^{15,17,20,21,24} Alcuni autori raccomandano l'intervento chirurgico solo nei casi refrattari alla terapia medica o nei casi con grave distensione cecale, mentre altri raccomandano un intervento chirurgico precoce.^{15,17,20,25,26} Se viene eseguito un intervento chirurgico, si deve decidere se eseguire una tiflotomia o una tiflotomia con procedura di *bypass* cecale. Indipendentemente dalla terapia scelta, è importante riconoscere che esistono numerose segnalazioni di cavalli con diagnosi di rottura dell'organo che avevano storie di coliche solo lievi e che tutti i proprietari dovrebbero essere informati del rischio di possibile rottura durante il trattamento delle occlusioni cecali.

La terapia medica per le inclusioni cecali comprende la sospensione del cibo, l'uso di metodi di controllo del dolore e dei liquidi per ammorbidire la massa nonché di agenti procinetici per migliorarne lo svuotamento. Poiché è noto che il dolore diminuisce la motilità gastrointestinale, l'uso giudizioso degli analgesici è importante nel trattamento delle ostruzioni di questo tratto intestinale. Viene utilizzata la flunixin meglumine (0,5–1,1 mg/kg, IV, ogni 12 ore) così come la xilazina (0,1–0,2 mg/kg, IV). Poiché il dolore

associato alle occlusioni cecali è spesso lieve, è imperativo monitorare l'occlusione mediante ripetuti esami rettali e non fare affidamento solo sulla risposta ai farmaci antidolorifici. La detomidina non dovrebbe essere utilizzata nelle occlusioni cecali a meno che la chirurgia non costituisca un'opzione di trattamento per il cavallo. Al momento non esistono studi che affrontino specificamente l'utilità del bromuro di N-butilscolopolammonio nelle occlusioni cecali.

Comunemente il mangime deve essere sospeso durante il trattamento. Poiché i segni delle coliche sono spesso lievi nei cavalli con ostruzioni cecali, gli animali spesso continuano a mangiare se ne hanno la possibilità. I proprietari spesso non sono consapevoli del fatto che ciò può aggravare la situazione. I lassativi orali (ad esempio, olio minerale e solfato di magnesio) vengono spesso somministrati una volta al giorno per favorire la reidratazione della massa occludente. È importante ricordare che nei cavalli con occlusioni cecali l'olio minerale può passare attorno all'occlusione e che questo non può essere utilizzato come indicatore della risoluzione del problema.

La fluidoterapia deve essere somministrata con l'obiettivo della reidratazione sistemica e dell'idratazione della massa di alimento per consentire la risoluzione dell'occlusione. Ciò può essere ottenuto per via enterale o parenterale. Numerosi studi stanno esaminando la fluidoterapia enterale per il trattamento delle ostruzioni del colon; tuttavia, nessuno affronta specificatamente l'uso di questo percorso per i cavalli con ostruzioni cecali. L'utilizzo di questa pratica terapeutica può tuttavia aumentare lo stato algico nei soggetti e non è di aiuto nel trattamento delle occlusioni cecali così come avviene per le occlusioni del grosso colon ascendente. In genere, devono essere utilizzati fluidi poli-ionici bilanciati a velocità comprese tra circa 120 e 240 ml/kg/giorno (2-4 volte la velocità del fluido di mantenimento).

Gli agenti procinetici possono invece essere utilizzati nei cavalli con occlusione cecale. Comunemente, la yohimbina (0,15 mg/kg, miscelata in 1 litro di liquido e somministrata in 30 minuti, IV, ogni 12 ore) è stata consigliata per il trattamento dell'occlusione cecale (F.M. Andrews, comunicazione personale, 2009). È stato segnalato che la yohimbina, un antagonista adrenergico alfa-2, migliora lo svuotamento gastrico nei cavalli dopo l'esposizione a endotossine.²⁷

Durante il trattamento medico è imperativo che i cavalli siano attentamente monitorati e che vengano eseguiti frequenti esami rettali a causa della possibilità non remota della rottura dell'organo. In uno studio retrospettivo, la decisione per l'intervento chirurgico si basava (i) sulla gravità del dolore al momento del ricovero, (ii) sulla persistenza del dolore o (iii) su un aumento della gravità del dolore durante il ricovero in ospedale, (iv) sulla gravità della distensione cecale all'esame rettale o (v) sul fallimento per rispondere al trattamento medico.¹⁵ Alcuni autori hanno praticato l'intervento chirurgico nei cavalli con occlusioni cecali refrattarie alla terapia medica o nei cavalli con grave distensione cecale, mentre altri autori sostengono l'intervento chirurgico precoce nella maggior parte dei casi.^{17,20} Lo studio citato¹⁵ ha rilevato che, sebbene il trattamento medico possa avere successo in alcuni cavalli con questo tipo di occlusioni, l'intervento chirurgico precoce è fondamentale nei cavalli che non rispondono alla terapia medica (che consisteva in liquidi IV, analgesici e olio minerale orale).

Il trattamento chirurgico delle occlusioni cecali prevede l'evacuazione del contenuto cecale e, in alcuni casi, il *bypass* dell'organo.^{15,17,25-29} Le procedure di bypass sono state originariamente sviluppate per ridurre i fenomeni di recidiva.^{22,25,28-30} La tiflotomia è più comunemente usata per evacuare il contenuto cecale. È stato segnalato che l'anastomosi cecocolica (non raccomandata a causa di possibili complicanze dovute a timpanismo cecale ricorrente) e l'anastomosi ileocolica e digiuno-colica vengono comunemente utilizzate come procedure di bypass.^{25,28,29} Tuttavia in uno studio retrospettivo, solo in 2 dei 37 cavalli trattati sono stati eseguiti interventi di bypass a testimonianza della rarità con cui la procedura si rende necessaria. La prognosi per la dimissione dall'ospedale è comunemente buona.¹⁵ In uno studio su 114 cavalli con occlusione cecale, 44 su 54 (81%) trattati con terapia medica sono stati dimessi, mentre 34 cavalli su 37 (91,8%) trattati chirurgicamente e guariti. Undici cavalli su 114 (9,6%) sono stati soppressi dopo l'esame iniziale e 12 su 37 (32%) sono stati soppressi durante l'intervento chirurgico a causa della presenza della rottura dell'organo. Sono state riportate informazioni sul *follow-up* di 47 cavalli e il tasso di sopravvivenza a lungo termine (vivi dopo > 1 anno) era del 91%. Il tasso di recidiva era del 13% (6/47 cavalli).

3.4 Costipazione del Colon Ascendente (Grosso Colon)

L'occlusione del grosso colon è comune nei cavalli ed è stata osservata nel 13,4% dei casi di coliche trattati presso un centro di riferimento.³¹ Lo stesso studio ha riportato che il 53,7% (79/147) dei cavalli che avevano avuto un cambiamento nella loro routine entro erano a rischio di sviluppare il problema entro un periodo di 2 settimane dall'episodio di colica.³¹ Tuttavia, una diminuzione dell'esercizio fisico a causa del confinamento in stalla, un generale aumento del tempo trascorso in una stalla, un recente cambiamento nel programma di esercizi, un comportamento di "*cribbing* o tic d'appoggio, una storia di viaggi entro 24 ore da un episodio di colica e la mancata somministrazione di antelmintici ivermectina o moxidectina sono stati identificati come fattori di rischio per lo sviluppo di ostruzioni del colon di grandi dimensioni in un altro studio.³² Si ritiene spesso che la diminuzione del consumo di acqua sia un fattore nello sviluppo di ostruzioni, probabilmente a causa del clima freddo, della mancanza di acqua disponibile o sistemi di abbeverata automatici guasti nelle stalle. Una dentatura caratterizzata da consumo anomalo è anche un fattore di rischio comune per lo sviluppo di ostruzioni del colon di grandi dimensioni. Alle cavalle e ai cavalli di età avanzata viene più comunemente diagnosticata un'ostruzione del grosso colon.³¹

La maggior parte delle ostruzioni di quest'organo si verificano nei siti in cui il diametro del lume intestinale diminuisce. La flessura pelvica è il sito più comune e tali occlusioni si sono verificate in 103 cavalli su 147 (70,1%) in uno studio.³¹ Ulteriori siti di occlusione includono il colon ventrale sinistro in 30 cavalli su 147 (20,4%) e i punti ventrale e dorsale del colon destro in 14 cavalli su 147 (9,5%).

I segni clinici variano a seconda della gravità dell'occlusione. Il dolore è generalmente da lieve a moderato, con pochi cavalli che mostrano gravi segni di colica. È interessante notare che in uno studio retrospettivo 70 cavalli su 147 (47,6%) non mostravano alcun segno di dolore addominale al momento dell'ammissione in strutture di cura.³¹ Nello stesso studio, 50 cavalli su 147 (34%) presentavano lievi segni di dolore addominale, 16 su 147 (10,9%) avevano dolore moderato e i restanti 11 su 147 (7%) mostravano dolore grave.

La maggior parte dei cavalli comunemente presenta borborigmi gastrointestinali ridotti o assenti. La diagnosi viene generalmente effettuata mediante palpazione rettale. Le inclusioni della flessura

pelvica e del colon ventrale sono generalmente palpabili; tuttavia, le inclusioni del colon dorsale destro possono essere difficili da palpare e distinguere dalle occlusioni cecali. È importante differenziare le occlusioni, che consistono in maggiori quantità di alimento e spesso sono dure, da un colon disidratato, che può anche essere duro al tatto ma generalmente è secondario a qualche altro tipo di colica. L'uso dell'analisi del liquido peritoneale può essere utile per determinare se l'intestino è compromesso benché i globuli bianchi e i solidi totali siano generalmente entro limiti normali nella maggior parte dei cavalli con ostruzioni del grosso colon.

Il trattamento medico per questa patologia a carico del tratto intestinale ha generalmente successo. I cavalli spesso rispondono ai farmaci orali somministrati tramite sondini nasogastrici e solo agli analgesici. I cavalli dovrebbero essere tenuti lontani dall'alimentazione fino alla risoluzione del problema. Si può somministrare olio minerale (1 litro tramite sondino nasogastrico una volta al giorno), ma è importante ricordare che, come per la costipazione del cieco, l'olio può circolare attorno all'occlusione. Si ritiene che il solfato di magnesio (1 g/kg una volta al giorno per 2-3 giorni in 2 litri di acqua, tramite sondino nasogastrico) causi la reidratazione delle feci e possa essere utilizzato nei cavalli che non sono disidratati sistemicamente. Flunixin meglumine (0,5–1,1 mg/kg/12 ore, EV) è solitamente l'analgesico di scelta.

Quando i trattamenti precedenti non hanno successo nel risolvere l'occlusione o si ritiene che l'occlusione sia grave, possono essere necessarie terapie più aggressive. Sebbene la maggior parte degli studi descriva l'uso di fluidi per via endovenosa, recentemente si è discusso dell'uso di elevati volumi di fluidi orali per risolvere le ostruzioni senza "iperidratare" sistematicamente il cavallo.^{33,34} Uno studio ha rilevato che l'uso di fluidi enterali ed endovenosi con il solfato di magnesio enterale aumenta l'idratazione del colon e delle feci e provoca l'espansione del plasma nei cavalli con occlusione del colon.³⁴ Questo studio ha inoltre rilevato che l'uso di fluidi enterali (10 L/ora per 6 ore tramite una sonda per alimentazione enterale equina) produceva maggiori cambiamenti nell'idratazione del cibo ingerito e delle feci rispetto all'uso di fluidi endovenosi (10 l/ora per 6 ore) con 1 g/kg di solfato di magnesio in 1 litro di acqua, somministrati all'inizio dello studio. Inoltre, si è osservata una tendenza verso una maggiore defecazione con l'uso di fluidi enterali,

supportando l'ipotesi della stimolazione del riflesso gastrocolico con la fluidoterapia enterale. Alcuni cavalli in quello studio mostravano fastidio addominale derivante dall'elevato volume di fluidi enterali. Le attuali raccomandazioni includono il ricorso a tale terapia utilizzando una soluzione elettrolitica bilanciata somministrata tramite sondino nasogastrico a 5-10 L/ora. Esistono ricette "empiriche" descritte in altri testi per preparare fluidi enterali equilibrati utilizzando acqua di rubinetto, sale, cloruro di potassio e bicarbonato di sodio.

Oltre ai fluidi enterali, vengono spesso somministrati liquidi per via endovenosa e sono necessari se il cavallo presenta una compromissione cardiovascolare o anomalie elettrolitiche. Questi fluidi vengono spesso somministrati a una velocità due o tre volte superiore a quella di mantenimento. Oltre a flunixin meglumine, la xilazina (0,3-0,8 mg/kg, IV o IM, ogni 2-4 ore) può essere utilizzata senza effetti dannosi clinicamente evidenti sulla motilità.³¹ Alcuni Medici utilizzano anche il butorfanolo (0,02 mg/kg, IV o IM). IM, ogni 6-8 ore), detomidina (0,1 mg/kg, EV, ogni 6-8 ore) o una combinazione di questi per controllare il dolore. Indipendentemente dagli analgesici somministrati, è importante valutare clinicamente la risposta del cavallo ai farmaci antidolorifici e il suo stato cardiovascolare durante il trattamento medico.

L'intervento chirurgico è indicato se il dolore addominale non è controllabile, se vi sono cambiamenti significativi nel liquido peritoneale o se si verifica un deterioramento dello stato cardiovascolare. In uno studio retrospettivo, 24 cavalli su 147 (16%) hanno richiesto un intervento chirurgico.³¹ La rottura dell'intestino è un rischio quando questi cavalli vengono portati in sala operatoria a causa del peso del colon. Il rischio di rottura deve essere discusso con il cliente prima dell'intervento. Vengono eseguite una celiotomia della linea mediana ventrale e un'enterotomia della flessione pelvica per consentire l'evacuazione del cibo dal colon. Spesso, il colon deve essere evacuato prima che venga completamente esteriorizzato dall'addome per evitare lacerazioni.

La prognosi per i cavalli con ostruzioni del colon di grandi dimensioni è eccellente ed è migliore per i cavalli trattati con la terapia medica rispetto a quelli trattati chirurgicamente. Nello studio retrospettivo di Dabareiner e White,³¹ il tasso di sopravvivenza a lungo termine era del 95,1% per i cavalli trattati farmacologicamente

e del 57,8% per i cavalli trattati chirurgicamente. Le complicazioni più comuni citate con la terapia di occlusione del grosso colon sono state tromboflebite della vena giugulare e diarrea. Dallo studio è emerso che il 32% (33/100) dei cavalli disponibili per gli esami di *follow-up* presentava uno o più episodi di colica dopo la dimissione dall'ospedale, un dato superiore al previsto. Gli autori hanno ipotizzato che questo potrebbe essere il risultato della disfunzione del colon dei cavalli che ha portato alla comparsa della costipazione o che tale condizione abbia causato danni permanenti che hanno predisposto il cavallo a successivi episodi di coliche.

3.5 Costipazione Del Colon Discendente (Piccolo Colon)

Secondo quanto riferito, le occlusioni del piccolo colon sono una delle condizioni più comuni (che colpiscono il 34% dei cavalli con malattia a carico di questo tratto intestinale); tuttavia uno studio ha rilevato che solo il 2,5% dei cavalli presentati per dolore addominale acuto presenta occlusioni del colon discendente.^{35,36} Analogamente ad altri tipi di occlusioni, il foraggio grossolano di scarsa qualità, dentatura irregolare, mancanza di acqua e disturbi della motilità sono stati suggeriti come fattori di rischio per le occlusioni del piccolo colon.³⁶ Alcuni studi hanno riscontrato una distribuzione stagionale della patologie, con la maggior parte dei casi osservati in autunno e inverno; tuttavia, altri studi non hanno identificato la distribuzione stagionale.³⁶⁻³⁸ In uno studio è stato riscontrato che i cavalli di età superiore a 15 anni, alcune razze di cavalli americani e i pony presentano un rischio maggiore di sviluppare ostruzioni del piccolo colon, mentre altri studi non hanno rilevato che l'età e la razza come fattori di rischio.³⁵⁻³⁸ Ai soggetti cui è stata diagnosticata questa affezione viene comunemente diagnosticata anche la colite; tuttavia, rimane indeterminato se le ostruzioni si verificano principalmente seguite da colite o se le ostruzioni sono il risultato della colite. Un recente studio retrospettivo ha identificato che i cavalli con ostruzioni del piccolo colon avevano una probabilità 10,8 volte maggiore di avere diarrea al momento del ricovero rispetto ai cavalli ricoverati con ostruzioni del grosso colon.³⁸ Gli autori non sono stati in grado di determinare se la diarrea fosse presente prima delle ostruzioni o viceversa. Due studi hanno stabilito che i cavalli trattati chirurgicamente per il piccolo colon possono avere un rischio maggiore di sviluppare salmonellosi, e uno degli studi ha affermato

che il 43% dei casi trattati chirurgicamente includeva colture fecali positive per Salmonella.^{36,37}; tuttavia non è chiaro se esista un'associazione causale tra l'ostruzione di questo tratto e la presenza del microrganismo.

I segni clinici sono simili ai segni osservati con altri tipi di ostruzioni. I più comunemente riportati sono dolore addominale (nella maggior parte dei casi descritto come da lieve a moderato), aumento della frequenza cardiaca e diminuzione della produzione di feci.^{36,37} La mancanza di borborigmi e la distensione addominale sono stati i successivi segni clinici più costantemente riportati negli studi clinici insieme a diarrea e diminuzione dell'appetito.^{36,37} Ulteriori segni includono febbre, difficoltà a defecare, depressione e reflusso nasogastrico.^{36,37} I valori ematologici sono generalmente entro valori di normalità nella maggior parte dei cavalli; tuttavia, alcuni cavalli possono mostrare leucopenia con spostamento a sinistra.^{36,37}

Una diagnosi definitiva viene solitamente effettuata mediante palpazione rettale (21/28 dei casi in uno studio e 70/84 dei casi in un altro studio).^{36,37} La maggior parte dei casi viene tuttavia diagnosticata durante l'intervento chirurgico.^{36,37} Oltre all'occlusione avvertita all'esame rettale, in diversi casi sono stati segnalati distensione gassosa del cieco o del grosso colon e mucosa rettale edematosa o ruvida.^{36,37}

Similmente ad altre occlusioni, il trattamento per le occlusioni del piccolo colon può essere medico o chirurgico. Un recente studio retrospettivo ha riportato che 23 casi su 44 (52%) sono stati trattati con terapia medica e 21 casi su 44 (48%) sono stati trattati chirurgicamente; mentre un altro riferiva 10 casi su 28 (36%) trattati con farmaci e 18 casi su 28 (64%) trattati chirurgicamente nell'altro.^{36,37}

La terapia medica comprende l'uso di fluidi endovenosi poli-ionici bilanciati a una velocità pari a due o tre volte la velocità di mantenimento, nonché di fluidi orali somministrati tramite sondino nasogastrico. Anche i lassativi osmotici sono comunemente usati e somministrati come descritto in precedenza in questo articolo. Flunixin meglumine e sedativi sono usati per gestire il dolore. Sebbene sia stato descritto l'uso dei clisteri in posizione eretta, il rischio associato alle rotture del retto è elevato e questa procedura non viene comunemente eseguita nei cavalli adulti. Ulteriori trattamenti più specifici per le occlusioni del piccolo colon

comprendono l'uso di antibiotici (penicillina e gentamicina) se il cavallo è leucopenico o di antisiero in presenza di *Salmonella typhimurium*.³⁶

L'intervento chirurgico viene eseguito più comunemente se il cavallo non risponde alla terapia medica o se è presente una grave distensione addominale ed il cavallo non risponde all'analgesia. Se il liquido peritoneale è anomalo (ad esempio aumento delle proteine, della conta dei globuli bianchi, dei globuli rossi o dei batteri) si deve seriamente prendere in considerazione l'intervento chirurgico perché alcune ostruzioni possono causare necrosi da compressione della parete dell'intestino tenue. Più comunemente, una celiotomia ventrale mediana e un clistere vengono eseguiti dal chirurgo utilizzando un delicato massaggio transmurale dall'interno dell'addome mentre un assistente fa passare un tubo ed eroga acqua attraverso il retto. Alcuni chirurghi consigliano inoltre di eseguire un'enterotomia del grosso colon per evacuare il grosso colon e ridurre il rischio di occlusione nell'immediato periodo postoperatorio.

La prognosi riportata per le piccole ostruzioni del colon varia da discreta a buona. In un recente rapporto, 21 cavalli su 23 (91%) trattati con terapia medica e 20 su 21 (95%) trattati chirurgicamente sono sopravvissuti fino alla dimissione.³⁸ Febbre e diarrea sono le complicanze post-trattamento (mediche o chirurgiche) più comunemente riportate.³⁸

3.5 Bibliografia

1. Henninger R, Horst J. Magnesium toxicosis in two horses. *J Am Vet Med Assoc* 1997;211:82–5.
2. Freeman D, Ferrente PL, Palmer JE. Comparison of the effects of intragastric infusions of equal volumes of water, dioctyl sodium sulfosuccinate, and magnesium sulphate on fecal composition and output in clinically normal horses. *Am J Vet Res* 1992;53:1347–53.
3. Moffat R, Kramer L, Lerner D, et al. Studies on dioctyl sodium sulfosuccinate toxicity: clinical, gross and microscopic pathology in the horse and guinea pig. *Can J Comp Med* 1975;39:434–41.
4. Bohanon T. Duodenal impaction in a horse. *J Am Vet Med Assoc* 1988;192:365–6.
5. Bridges E, Jamison KC, Lowder MQ. Duodenal phytobezoar with secondary perforating gastric ulcer in an adult equine horse. *Vet Clin North Am Equine Pract* 1993;15:34.
6. Dixon R. Intestinal obstruction in a gelding. *Aust Vet J* 1965;41:20–2.
7. Green P, Tong JMJ. Small intestinal obstruction associated with wood chewing in two horses. *Vet Rec* 1988;123:196–8.
8. Turner T. Trichophytobezoar causing duodenal obstruction in a horse. *Comp Contin Educ Pract Vet* 1986;8:977–8.
9. Wilson R, Scruggs DW. Duodenal obstruction associated with persimmon fruit digestion by two horses. *Equine Vet Sci* 1992;12:26–8.
10. Little D, Blikslager AT. Factors associated with the development of ileal impaction in horses with surgical colic: 78 cases (1986–2000). *Equine Vet J* 2002;34(5): 464–8.
11. Proudman C, French NP, Trees AJ. Tapeworm infection is a significant risk factor for spasmodic colic and ileal impaction colic in the horse. *Equine Vet J* 1998;30: 194–9.
12. Hanson R, Wright JC, Schumacher J, et al. Surgical reduction of ileal impactions in the horse: 28 cases. *Vet Surg* 1998;27:555–60.
13. Parks A, Doran RE, White NA, et al. Ileal impaction in the horse: 75 cases. *Cornell Vet* 1989;79:83–91.
14. Hanson R, Schumacher J, Humburg J, et al. Medical treatment of horses with ileal impactions: 10 cases (1990–1994). *J Am Vet Med Assoc* 1996;208(6):898–900.
15. Plummer A, Rakestraw PC, Hardy J, et al. Outcome of medical and surgical treatment of cecal impaction in horses: 114 cases (1994–2004). *J Am Vet Med Assoc* 2007;231(9):1378–85.
16. White N. Epidemiology and etiology of colic. In: NA W, editor. *The equine acute abdomen*. Philadelphia: Lea & Febiger; 1990. p. 49–64.
17. Campbell M, Colahan PC, Brown MP, et al. Cecal impaction in the horse. *J Am Vet Med Assoc* 1984;184(8):950–2.
18. Dabareiner R, White NA. Diseases and surgery of the cecum. *Vet Clin North Am Equine Pract* 1997;13:303–15.
19. White N. Diseases of the cecum. In: NA W, editor. *The equine acute abdomen*. Philadelphia: Lea & Febiger; 1990. p. 369–74.
20. Collatos C, Romano S. Cecal impaction in horses: causes, diagnosis and medical treatment. *Compend Contin Educ Pract Vet* 1993;15(7):976–81.
21. Dart A, Hodgson DR, Snyder JR. Cecal disease in equids. *Aust Vet J* 1997;75:

552–7.

22. Ross M, Martin BB, Donawick WJ. Cecal perforation in the horse. *J Am Vet Med Assoc* 1985;187:249–53.
23. White N, Lessard P. Risk factors and clinical signs associated with cases of equine colic. Presented at the 32nd Annual Meeting of American Association of Equine Practitioners, 1986.
24. Roberts C, Sloan DE. Cecal impactions managed surgically by typhlotomy in 10 cases (1988–1998). *Equine Vet J Suppl* 2000;32:74–6.
25. Ross M, Tate LP, Donawick WJ, et al. Cecocolic anastomosis for the surgical management of cecal impaction in horses. *Vet Surg* 1986;15:85–92.
26. Craig D, Pankowski R, Car B, et al. Ileocolostomy—a technique for surgical management of equine cecal impaction in horses. *Vet Surg* 1987;16:451–5.
27. Meisler SD, Doherty TJ, Andrews FM, et al. Yohimbine ameliorates the effects of endotoxin on gastric emptying of the liquid marker acetaminophen in horses. *Canadian Journal of Veterinary Research* 2000;64:208–11.
28. Ross M, Orsini JA, Ehnen SJ. Jejuncolic anastomosis for the surgical management of recurrent cecal impaction in a horse. *Vet Surg* 1987;16:265–8.
29. Gerard M, Bowman KF, Blickslager AT, et al. Jejunculostomy or ileocolostomy for treatment of cecal impaction in horses: nine cases (1985–1995). *J Am Vet Med Assoc* 1996;209:1287–90.
30. Symm W, Nieto JE, VanHoogmoed L, et al. Initial evaluation of a technique for complete cecal bypass in the horse. *Vet Surg* 2006;35:674–7.
31. Dabareiner R, White NA. Large colon impaction in horses: 147 cases (1985–1991). *J Am Vet Med Assoc* 1995;206(5):679–85.
32. Hillayer M, Taylor FG, Proudman CJ, et al. Case control study to identify risk factors for simple colonic obstruction and distension colic in horses. *Equine Vet J* 2002;34:455–63.
33. Hallowell G. Short communication: retrospective study assessing efficacy of treatment of large colonic impactions. *Equine Vet J* 2008;40(4):411–3.
34. Lopes M, Walker BL, White NA, et al. Treatments to promote colonic hydration: enteral fluid therapy versus intravenous fluid therapy and magnesium sulphate. *Equine Vet J* 2002;34(5):505–9.
35. Dart A, Snyder JR, Pascoe JR, et al. Abnormal conditions of the equine descending (small) colon: 102 cases (1979–1989). *J Am Vet Med Assoc* 1992;200(7): 971–8.
36. Rhoads W, Barton MH, Parks AH. Comparison of medical and surgical treatment for impaction of the small colon in horses: 84 cases (1986–1996). *J Am Vet Med Assoc* 1999;214(7):1042–7.
37. Ruggles A, Ross MW. Medical and surgical management of small-colon impaction in horses: 28 cases (1984–1989). *J Am Vet Med Assoc* 1991;199(12):1762–6.
38. Frederico L, Jones SL, Blickslager AT. Predisposing factors for small colon impaction in horses and outcome of medical and surgical treatment: 44 cases (1999–2004). *J Am Vet Med Assoc* 2006;229(10):1612–6.

4. RISPOSTA INFIAMMATORIA SISTEMICA NEI CAVALLI CON COLICHE

4.1 Sindrome Da Risposta Infiammatoria Sistemica (SIRS)

Più di 20 anni fa, i medici umani lottavano per definire al meglio i diversi scenari clinici che dovevano affrontare con pazienti gravemente malati che erano ad aumentato rischio di sviluppare complicazioni potenzialmente letali o di morire. Nella loro esperienza, molti dei pazienti con traumi, ischemia, pancreatite o lesioni tissutali hanno mostrato segni clinici identici a quelli associati alle infezioni, ma non avevano fonti identificabili di infezione o batteri nel flusso sanguigno. Nel tentativo di descrivere la situazione di questi pazienti, hanno coniato l'espressione sindrome da risposta infiammatoria sistemica o *Systemic Inflammatory Response Syndrome* (SIRS) e hanno identificato i criteri che dovevano essere soddisfatti affinché un paziente potesse avere la SIRS.¹ Questi criteri includevano cambiamenti specifici della temperatura corporea, della frequenza cardiaca, frequenza respiratoria e conta dei globuli bianchi; almeno ² di questi cambiamenti dovevano esistere prima che un paziente avesse la SIRS.

Molti cavalli con coliche e puledri neonatali critici mostrano segni clinici simili a quelli descritti per la SIRS. Di conseguenza, sono stati proposti almeno 2 gruppi di criteri per definire la SIRS nei cavalli e nei puledri. In uno studio su puledri critici presentati a una clinica ospedaliera universitaria per la valutazione e il trattamento, la presenza di SIRS era basata sul soddisfacimento di almeno 2 dei seguenti criteri: leucocitosi, leucopenia o neutrofili a banda immatura superiore al 10%, ipertermia o ipotermia, tachicardia, tachipnea ed evidenza di sepsi.² Oltre il 40% dei puledri valutati avevano una diagnosi di SIRS. Utilizzando una serie di criteri leggermente modificati (leucocitosi, leucopenia o neutrofili a banda immatura >10%, ipertermia, tachicardia e tachipnea), Epstein e colleghi³ hanno determinato che quasi il 30% dei cavalli adulti presentati per la valutazione e il trattamento delle coliche avevano evidenza di SIRS (Riquadro 1).

Finora, le malattie che sono state associate alla presenza di SIRS nei puledri neonati sono principalmente batteriemia, infezioni batteriche locali (ad esempio, infezione ombelicale, polmonite, artrite settica e pielonefrite) e sindrome di asfissia perinatale.² , le

malattie associate alla SIRS nei cavalli adulti sono limitate a quelle che coinvolgono il tratto gastrointestinale,³ comprese le malattie infiammatorie intestinali (ad esempio enterite e colite) e le ostruzioni da strangolamento (ad esempio. lipomi pedunculati, volvolo del grosso colon e intrappolamenti o strangolamenti dell'intestino tenue). È stato inoltre suggerito che la SIRS e la laminite correlata alla sepsi si manifestino in cavalli con pleuropolmonite, endometrite settica e sovraccarico di carboidrati nel tratto gastrointestinale,⁴ sebbene studi specifici disegnati per documentare la comparsa della SIRS in queste malattie debbano ancora essere prodotti. Inoltre, le manifestazioni cliniche della polmonite nei puledri causata da *Rhodococcus equi*, un organismo Gram-positivo, sono coerenti con la presenza di SIRS.⁵

Riquadro 1. *Criteri per la diagnosi della Sindrome da Risposta Infiammatoria Sistemica (Almeno due di questi devono essere presenti) Moore JN, Vandenplas ML. Is it the systemic inflammatory response syndrome or endotoxemia in horses with colic? Vet Clin North Am Equine Pract. 2014 Aug;30(2):337-51, vii-viii. doi: 10.1016/j.cveq.2014.04.003.*

1. Anormalità nella conta dei leucociti o distribuzione (leucopenia, leucocitosi, o >10% neutrofili bandati
2. Ipertermia o ipotermia
3. Tachicardia
4. Tachipnea
5. Segni di sepsi nel puledro

4.2 Il Sistema Immunitario Innato

La prima linea di difesa contro i microrganismi che causano malattie è il sistema immunitario innato. In linea con il suo nome, il sistema immunitario innato è presente in tutti gli individui e risponde rapidamente all'agente patogeno, il più delle volte in pochi minuti. In termini evolutivi, è anche la forma più antica di immunità, esistente in specie dalle piante ai mammiferi. Nella maggior parte dei casi, queste risposte immunitarie sono sufficienti a prevenire l'invasione dei tessuti da parte degli agenti patogeni e lo sviluppo di infezioni. Tuttavia, il sistema immunitario innato non fornisce memoria a lungo termine o specificità selettiva contro gli agenti patogeni; questa responsabilità è lasciata al sistema immunitario adattativo. Una delle funzioni primarie del sistema immunitario innato è reclutare fagociti, principalmente neutrofili e fagociti mononucleati, nell'area del danno tissutale; ciò si ottiene attraverso la produzione e il rilascio di mediatori chimici chiamati citochine. In

tal modo, queste citochine, oltre ad altri mediatori rilasciati o espressi dalle cellule infiammatorie reclutate, causano i tipici risultati clinici associati all'infiammazione, vale a dire arrossamento localizzato, calore, gonfiore e dolore. Questi risultati sono dovuti a cambiamenti fisiologici locali, tra cui la dilatazione dei vasi sanguigni, lo stravasamento di proteine e liquidi plasmatici e una riduzione della soglia per la stimolazione dei nocicettori che percepiscono il dolore. I componenti del sistema immunitario innato che funzionano più rapidamente sono fattori solubili specifici che esistono nella circolazione e nei fluidi extracellulari o sono secreti dalle cellule epiteliali. Lo scopo di questi fattori è uccidere gli agenti patogeni o almeno ridurre la probabilità che stabiliscano un'infezione attiva. Questi fattori includono enzimi, come il lisozima, che digeriscono le pareti cellulari batteriche, il sistema del complemento che identifica e prende di mira i patogeni per la lisi e fagocitosi, e peptidi antimicrobici che causano la lisi diretta delle membrane cellulari batteriche. Una componente del sistema immunitario innato ad azione più lenta è il riconoscimento delle molecole microbiche, chiamate modelli molecolari associati ai patogeni o *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMP) da parte dei recettori cellulari. I più notevoli di questi PAMP sono l'endotossina (cioè, il lipopolisaccaride [LPS]), la flagellina, il peptidoglicano, l'acido lipoteicoico, l'RNA virale a doppio filamento e i CpG non metilati.⁶ Il legame di questi PAMP ai rispettivi recettori determina l'attivazione delle cellule e l'avvio di ulteriori risposte progettate per combattere gli agenti patogeni ed eliminarli dal corpo. La natura critica del sistema immunitario innato è esemplificata dagli effetti deleteri delle anomalie genetiche che ne risultano in assenza o disfunzione di uno o più componenti del sistema.

4.3 Recettori Per Il Riconoscimento Del Modello E Loro Ruolo Nella Sirs Equina

Le risposte immunitarie innate alle infezioni sono mediate attraverso classi distinte di recettori espressi sulla superficie delle cellule o nei compartimenti intracellulari, tra cui: recettori toll-like o *Toll-Like Receptor* (TLR); recettori contenenti ripetizioni ricche di leucina che legano nucleotidi; recettori simili al gene-1 inducibili dall'acido retinoico; lectine di tipo C; e inflammosomi-recettori AIM.

La struttura e la funzione di questi recettori sono state esaminate in dettaglio recentemente da Bryant e Monie.⁷ Di questi recettori, solo i TLR sono stati studiati nelle cellule equine, quantificando l'espressione dei geni che codificano le singole proteine TLR stesse (cioè, TLR1 –TLR10) in diversi tessuti e cellule equini, monitorando le risposte dei leucociti equini esposti a stimoli che attivano TLR specifici in altre specie, valutando l'espressione eterologa di TLR specifici (ad esempio, TLR4, TLR8 e TLR9) in cellule HEK, o identificando gli omologhi del gene TLR equino (ad esempio, TLR7).⁸⁻¹⁵ Sebbene numero preciso dei TLRs negli equini non sia stato determinato è noto che la funzione e il numero di TLR possono differire tra specie più lontanamente imparentate (Riquadro 1).⁷

4.4 TLR4 e le sue interazioni con LPS

Il TLR più studiato è il TLR4 che, insieme al suo recettore accessorio, MD-2, risponde alle endotossine monomeriche. L'LPS presente in natura, un componente vitale delle pareti cellulari dei batteri gram-negativi, è costituito da 3 parti strutturali distinte.¹⁶ Il dominio dell'antigene O polisaccaridico più esterno dell'LPS è un polimero glicano ripetitivo che varia da ceppo a ceppo ed è un bersaglio per il riconoscimento da parte degli anticorpi ospiti; questo è collegato a un dominio centrale costituito da oligosaccaridi meno varianti. Il componente più interno dell'LPS, il lipide A, è un disaccaride glucosamina fosforilato legato fino a 6 acidi grassi idrofobici. Il lipide A ancora la molecola LPS nella membrana cellulare batterica, è responsabile di molti degli effetti tossici dei batteri gram-negativi ed è il ligando più piccolo riconosciuto da TLR4/MD-2. Avendo sia porzioni lipidiche idrofobe che zuccheri idrofili, l'LPS forma micelle in soluzioni acquose. Queste caratteristiche dell'LPS sono importanti per la regolazione del suo movimento nella circolazione e la sua interazione con le cellule. Il legame di LPS a TLR4 avvia cascate di segnalazione cellulare, attivazione della cellula e sintesi di mediatori associati all'infiammazione. Le cellule equine, in particolare i monociti, sono altamente sensibili alla presenza di LPS, avendo una concentrazione tale per cui si ottiene la metà dell'effetto massimo (EC50) compresa tra 0,013 e 0,030 ng/mL per l'LPS di *Escherichia coli* per il rilascio del fattore di necrosi tumorale tipo α (TNFα) ed espressione del fattore tissutale.¹³ Questa bassa EC50 dimostra l'elevata sensibilità dei

cavalli alla presenza di LPS nella circolazione.

Riquadro 2. Esempi di ligandi per i recettori toll-like negli equini Moore JN, Vandenplas ML. Is it the systemic inflammatory response syndrome or endotoxemia in horses with colic? Vet Clin North Am Equine Pract. 2014 Aug;30(2):337-51, vii-viii. doi: 10.1016/j.cveq.2014.04.003.

2	TLR1/	Triacyl lipopeptides (synthetic analogue, Pam ₃ CSK ₄)
	TLR2	Lipoproteins, peptidoglycan, lipoteichoic acids
	TLR3	Double-stranded viral RNA (synthetic analogue, poly I:C)
	TLR4	Lipopolysaccharide
	TLR5	Flagellin
2	TLR6/	Zymosan
	TLR7	Single-strand RNA, imidazoquinolines
	TLR8	Single-strand RNA, imidazoquinolines
	TLR9	Unmethylated CpG DNA
	TLR10	Undetermined

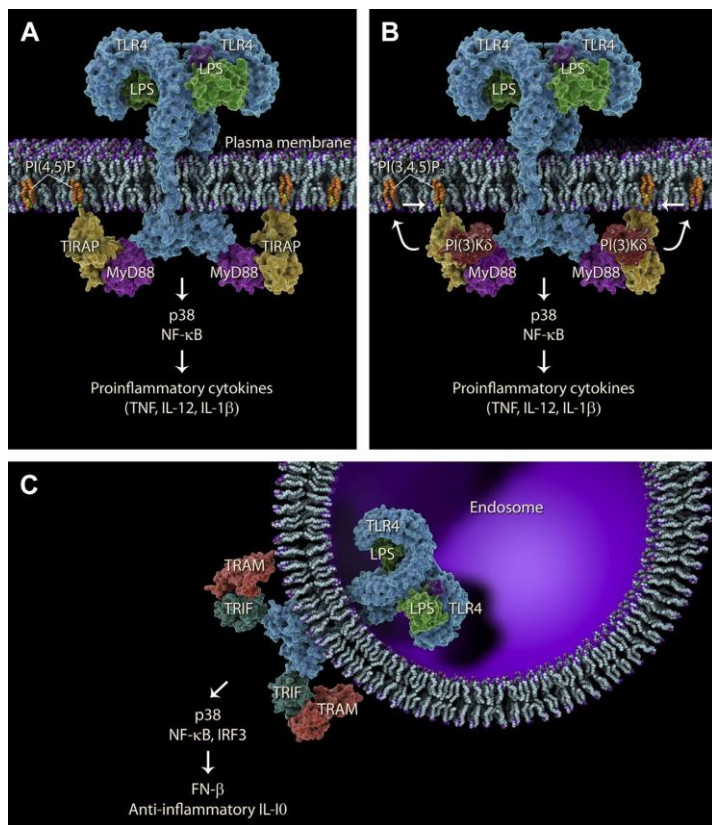
4.5 Il Percorso del Segnale Attivato dal TLR4

Prima di interagire con TLR4, i monomeri di LPS devono essere rilasciati dalle micelle che si sono formate nel plasma. Questo processo è facilitato da una specifica proteina sierica chiamata proteina legante LPS.¹⁷ I monomeri LPS asportati vengono quindi trasferiti a un recettore chiamato CD14, che esiste attaccato alla superficie delle cellule mieloidi mediante un legame fosfatidilinositolo o una proteina solubile nel plasma. Dopo essersi legato al CD14, LPS può interagire con TLR4 e la sua proteina co-recettore, MD-2. I recettori TLR4 si uniscono quindi per avviare l'attivazione di percorsi intracellulari discreti. Sulla base delle informazioni provenienti dal vasto lavoro svolto utilizzando cellule di altre specie, l'attivazione di TLR4 porta al reclutamento dipendente dalla proteina associata al recettore TLR/interleuchina (IL)-1 (TIRAP) della proteina adattatrice MyD88.^{18,19} Reclutamento di MyD88 ha 2 effetti che si verificano nel citosol: (1) degradazione di IκB e successiva attivazione del fattore nucleare di trascrizione κB (NF-κB) e (2) fosforilazione delle proteine chinasi attivate dal mitogeno e attivazione di ulteriori fattori di trascrizione NF-κB e gli altri fattori di trascrizione si spostano quindi nel nucleo, legandosi a siti specifici nelle regioni promotrici dei geni associati all'infiammazione. Questo legame induce la trascrizione di una varietà di geni, compresi quelli per i mediatori proinfiammatori come TNFα e IL-1b. Questa prima serie di eventi porta

principalmente al rilascio di mediatori proinfiammatori.

Dopo un ritardo, i recettori TLR4 attivati da LPS reclutano altre 2 molecole adattatrici: TRIF e TRAM.^{19,20} Questi passaggi portano all'attivazione secondaria e ritardata di NF- κ B e delle proteine chinasi attivate dal mitogeno e all'attivazione e alla traslocazione nucleare del fattore di trascrizione interferone fattore regolatorio 3 o *Interferon Regulatory Factor 3* (IRF3). Una volta all'interno del nucleo, l'IRF3 promuove l'espressione del gene dell'interferone (IFN) α/β e la successiva induzione di geni sensibili all'IFN, come CCL5 (RANTES) e IP-10. Il risultato di questi processi è una maggiore espressione del gene che codifica per il mediatore antinfiammatorio IL-10. Pertanto, mentre la via MyD88 promuove la produzione di mediatori proinfiammatori, la via TRIF è considerata antinfiammatoria.²⁰ Sulla base di studi che utilizzano cellule dendritiche umane, avviene il passaggio tra le vie di segnalazione MyD88 e TRIF (Figura 1). Questa commutazione è controllata dall'isoforma delta della fosfatidilinositolo-3-OH chinasi (PI(3)K), con PI(3)K δ attivato che porta al rilascio di TIRAP e MyD88 dai TLR4 nella membrana cellulare.²¹ Come conseguenza di questi e altri processi (ad esempio, la mobilitazione del calcio), TLR4 viene quindi internalizzato negli endosomi dove può interagire con il TRIF associato al TRAM.²⁰ Il tempo richiesto per l'internalizzazione del TLR4 aiuta a spiegare l'attivazione ritardata del percorso TRIF rispetto a quello del Percorso MyD88.

Figura 16. Segnalazione intracellulare distale al recettore toll-like 4 (TLR4). La segnalazione di TLR4 avviene in 3 passaggi essenziali. (A) Il legame del lipopolisaccaride (LPS) al dominio extracellulare di TLR4 provoca la dimerizzazione del recettore, il reclutamento di MyD88 al fosfatidilinositolo (4,5) bisfosfato (PI (4,5) P2) associato Proteina associata al recettore TLR/interleuchina-1 (TIRAP) e induzione di risposte proinfiammatorie. (B) Attraverso l'azione della fosfatidilinositolo-3-OH chinasi d (PI(3)Kd), l'ancora di membrana del TIRAP, PI(4,5)P2 viene fosforilata per produrre fosfatidilinositolo(3,4,5)trifosfato (PI (3,4,5)P3), causando così il rilascio di TIRAP e MyD88. (C) Di conseguenza TLR4 viene internalizzato, dove si associa al complesso TRAM/TRIF, consentendo l'avvio di risposte antinfiammatorie. FN- β , interferone- β ; IL, interleuchina; IRF3, fattore regolatore dell'interferone 3; NF- κ B, fattore nucleare- κ B; TNF, fattore di necrosi tumorale. (Illustrazioni di Brad Gilleland; Università della Georgia, Atene, GA.). Moore JN, Vandenplas ML. Is it the systemic inflammatory response syndrome or endotoxemia in horses with colic? *Vet Clin North Am Equine Pract.* 2014 Aug;30(2):337-51, vii-viii. doi: 10.1016/j.cveq.2014.04.003.



4.6 Altri TLRs equini e loro PAMP

Il TLR che riconosce principalmente i componenti dei batteri gram-positivi è TLR2. Quando legato da uno dei suoi ligandi batterici, TLR2 forma eterodimeri con TLR1 o TLR6, il che si traduce nell'attivazione solo della via MyD88. I ligandi per TLR2 includono peptidoglicano, proveniente principalmente dalle pareti cellulari di batteri gram-positivi ma, in misura minore, da batteri gram-negativi, lipoarabinomannano micobatterico, acido lipoteicoico, lipoproteine e lievito *zymozan*.^{6,7} Di particolare interesse per la medicina equina, VapA, una delle proteine codificate dal grande plasmide di virulenza in *R. equi*, è un ligando per TLR2, indicando che le risposte mediate da TLR2 a *R. equi* potrebbero contribuire in modo importante alla malattia polmonare equina.²² Pertanto, attualmente TLR2 sembra essere il più promiscuo dei TLR caratterizzati in termini di numero di diversi tipi di ligandi microbici che riconosce.

Nei monociti equini in coltura, il ligando sintetico TLR2, PAM3CSK4, induce l'espressione dei geni per TNF α e IL-1b, ma non per i geni TRIF-dipendenti (in particolare CCL5, IFN γ e IP-10).¹³ Pertanto, come le cellule di altri mammiferi, TLR2 nei monociti equini segnala solo attraverso MyD88. L'EC50 di PAM3CSK4 che determina il rilascio di TNF α e l'espressione del fattore tissutale da parte di queste cellule è compreso tra 1,0 e 4,7 ng/mL.¹³ Queste concentrazioni sono ordini di grandezza superiori a quelle richieste per l'avvio di queste stesse risposte da parte di LPS. Nel caso della proteina VapA rodococcica, le concentrazioni locali del ligando nel sito dell'infezione batterica nel polmone possono essere molto più importanti delle concentrazioni di VapA poiché è disseminata nella circolazione.

I TLR sono importanti anche nel riconoscimento dei virus, essendo questa funzione di responsabilità del TLR3. Il poli I:C, un mimetico dell'RNA virale a doppio filamento, attiva i monociti equini in coltura in modo dose-dipendente e determina l'espressione di geni (IFN γ , CCL5 e IL-10) che dipendono dal coinvolgimento di TRIF.¹³ In altri mammiferi TLR3, situato negli endosomi, segnala esclusivamente attraverso la via TRIF. A causa della localizzazione intracellulare di TLR3, la EC50 di poli I:C richiesta per l'espressione di IFN γ da parte di monociti equini non è stata determinata con precisione ma sembra essere elevata (intervallo >mg/mL). Sebbene molti dei retrovirus responsabili delle malattie virali equine (ad

esempio, il virus dell'anemia infettiva equina, il virus dell'arterite equina e il virus dell'encefalite equina orientale) abbiano genomi di RNA a filamento singolo, regioni dei loro genomi possono essere a doppio filamento e quindi potenzialmente potrebbero agire come ligandi TLR3.^{23,24} Tuttavia, questo suggerimento è mitigato dalla scoperta che il virus dell'arterite equina segnala attraverso MyD88 l'attivazione di NF- κ B.²⁵ È anche noto che i virus possono avere un effetto importante sulle risposte TLR, poiché molti virus possono regolare NF- κ B.²⁶ Ad esempio, un fattore del virus della West Nile, NS1, può bloccare l'attivazione mediata da TLR3 di NF- κ B e IRF3.²⁷ È chiaro che sono necessarie ulteriori ricerche per affrontare gli effetti dell'infezione virale sull'inizio e sulla modulazione dell'attività della risposta immunitaria innata mediata da TLR nei cavalli.

Come avviene in altre specie, la flagellina batterica è riconosciuta dal TLR5 nelle cellule equine. I neutrofili equini producono specie reattive dell'ossigeno (ROS) in risposta alla flagellina, con un EC50 compreso tra 20 e 40 ng/mL.¹⁴ Queste concentrazioni sono circa 10 volte maggiori di quelle associate all'attivazione dei monociti da parte del ligando TLR2, PAM3CSK4.¹³ Analogamente a TLR2 e alla maggior parte degli altri TLR, la segnalazione di TLR5 solo attraverso la via MyD88 e nei neutrofili equini porta all'induzione dell'espressione del gene TNF α e della cicloossigenasi-2.¹⁴

Il TLR8 equino nei test del gene reporter risponde in modo simile ai ligandi di altri mammiferi superiori (ad esempio, esseri umani e mucche), ma è distinto dalle risposte del ligando TLR8 dei roditori,²⁸ a causa della perdita di 5 aminoacidi nell'ectodominio del TLR8 dei roditori. Il ligando naturale di questo recettore è l'RNA virale a filamento singolo. Il TLR9 equino, come riscontrato in altre specie, risponde al DNA CpG, ma queste risposte non sono state esaminate in grande dettaglio nelle cellule equine. È interessante notare che mentre le risposte dei neutrofili equini all'attivazione di TLR9 includono il rilascio di ROS e l'induzione dell'espressione dei geni IFN γ , IL-8 e IL-12, l'espressione del gene TNF α è stata significativamente ridotta entro 4 ore dopo la stimolazione.²⁹ TLR8 e TLR9 sono strettamente correlati e pertanto hanno risposte sovrapposte ai ligandi sintetici e, analogamente a TLR3, hanno una posizione intracellulare che complica la determinazione dell'EC50.²⁸

Finora le risposte cellulari indotte dal ligando di altri TLR noti per essere espressi dalle cellule equine non sono state caratterizzate e

il loro potenziale contributo alla SIRS nei cavalli non è noto.

4.7 Mediatori Rilasciati Tramite l'attivazione Dei TLR e Loro Effetti Fisiologici

La conseguenza dell'attivazione dei TLR è l'induzione e il rilascio di mediatori proinfiammatori da monociti e neutrofili del sangue periferico. Questi mediatori includono prostaglandine, citochine, attività procoagulante (cioè fattore tissutale) e ROS.^{13,30} La tempistica e l'entità di queste risposte cellulari sono importanti per l'instaurazione della SIRS. Ad esempio, l'induzione dell'espressione del gene TNFα è rapida e transitoria (1 ora dopo la stimolazione), l'induzione dell'espressione del gene IL-1β è sostenuta per un intervallo di tempo più lungo (fino a 20 ore dopo la stimolazione) e l'induzione dell'IL-6 l'espressione è ritardata e sostenuta (da 4 a 20 ore).¹³ I mediatori proinfiammatori causano una sequenza secondaria di eventi mediati attraverso recettori cellulari su cellule adiacenti. Questi eventi secondari sono in parte responsabili dei sintomi clinici osservati nei cavalli con coliche, tra cui dolore addominale, tachicardia, alterazioni dei borborigmi e aumento della temperatura rettale. Lo scopo sottostante le risposte proinfiammatorie immediate del sistema immunitario innato ai microbi è quello di distruggere e rimuovere gli agenti patogeni invasori. È la forte attivazione e sovrapproduzione di questi mediatori che è deleteria per l'animale ospite. Di conseguenza, le risposte cellulari includono anche la produzione di citochine antinfiammatorie (ad esempio, IL-10) e altri mediatori (ad esempio, adenosina), oltre alla *downregulation* dei recettori TLR attraverso l'endocitosi mediata dai recettori e la degradazione di elementi delle vie di segnalazione intracellulare distali al recettore. Quest'ultimo processo, noto come tolleranza, provoca un'induzione ritardata dell'espressione del gene TLR per ristabilire i TLR e ripristinare la reattività cellulare.³¹ Nei monociti equini, LPS e PAM3CSK4, componenti batterici che segnalano inizialmente attraverso TLR4 e TLR2, rispettivamente, e poi attraverso MyD88, causa l'induzione di entrambi i geni TLR4 e TLR2.³² Al contrario, l'attivazione indotta da poli I:C della via TRIF attraverso TLR3 non causa l'induzione dell'espressione di TLR4 e TLR2. Pertanto, l'equilibrio tra mediatori proinfiammatori e antinfiammatori determina anche il destino della risposta del sistema immunitario

innato dell'ospite. Nei cavalli, questo culmina spesso nella SIRS.

4.8 Differenze nella Risposta delle Cellule Equine all'attivazione dei TLR

Risposte del TLR4 equino ai LPS

Contrariamente alle risposte indotte da LPS in altre specie di mammiferi, l'attivazione da parte di LPS di TLR4 nei monociti equini porta solo all'attivazione della via MyD88.¹³ Questa eventualità è illustrata dall'induzione rapida e transitoria dell'espressione del gene TNF α , la rapida e un'espressione sostenuta del gene dell'IL-1 β , e l'attivazione più lenta ma sostenuta dell'espressione del gene dell'IL-6 indotta da LPS nei monociti del sangue periferico equino. L'espressione di questi 3 geni è il segno distintivo dell'attivazione di MyD88. Al contrario, anche elevate concentrazioni di LPS non riescono a indurre l'espressione di CCL5 o IFN γ , segni distintivi dell'espressione genica governata dalla via TRIF/IRF3.¹³ È interessante notare che le risposte TLR4 equine a LPS sono molto simili a quelle indotte attraverso l'attivazione della via TRIF/IRF3. MyD88 dai ligandi TLR2 e distinti da quelli indotti attraverso la via TRIF-dipendente dall'attivazione di TLR3.¹³ Degne di nota sono le grandi differenze nel tempo richiesto per indurre l'espressione del gene IL-10 e l'entità di questa risposta mediante l'attivazione di TLR2. questi 3 diversi TLR. Sebbene l'attivazione di TLR2 o TLR4 porti all'induzione dell'espressione del gene IL-10, l'entità della risposta è molto maggiore per l'attivazione di TLR3. Questo fatto è particolarmente importante dato che l'impegno della via TRIF è considerato di natura antinfiammatoria, mentre la via MyD88 è responsabile dell'induzione di uno stato proinfiammatorio (Figura 1).²⁰ La commutazione della segnalazione TLR4 tra MyD88 e TRIF è controllato attraverso l'azione di PI(3)K. Questo evento di commutazione sembra essere assente nei monociti equini.¹³ Considerato il basso EC50 richiesto affinché LPS induca l'espressione dei geni delle citochine proinfiammatorie nei monociti equini, il fatto che TLR4 nei monociti equini segnali solo attraverso MyD88 e la mancanza di induzione di TRIF- dipendenti da citochine antinfiammatorie da parte del TLR4 equino, le risposte proinfiammatorie dei monociti equini all'LPS possono essere molto più forti di quelle che si verificano in altre specie animali.

Risposte LPS agonista/antagonista

Oltre alle differenze nelle vie di segnalazione intracellulare utilizzate da TLR4 nei monociti equini rispetto a quelle utilizzate da TLR4 in altre specie animali, il TLR4 equino risponde anche in modo diverso a tipi specifici di LPS rispetto a quello del TLR4 di altre specie. Ad esempio, l'LPS isolato dal *Rhodobacter sphaeroides* antagonizza gli effetti proinfiammatori dell'LPS di *E. coli* nelle cellule umane e murine, ma induce risposte proinfiammatorie tramite TLR4 nelle cellule equine.¹⁰ Allo stesso modo, il derivato dell'LPS, Lipid IVA, un composto che agisce come un antagonista dei LPS dell'*E. coli* nelle cellule umane, è un agonista nelle cellule equine.³³ Il sintetico E5531, un composto sviluppato per il trattamento dell'endotossemia basato sulla struttura del lipide A di *R. sphaeroides*, è simile ad un progenitore dell'LPS, un antagonista dell'LPS di *E. coli* nelle cellule umane, ma un agonista nelle cellule equine.³⁴ Tuttavia, E5564, un composto sintetico con sottili differenze strutturali rispetto a E5531, agisce come un antagonista del TLR4 sia nelle cellule umane che in quelle equine.³⁵ Pertanto, lievi differenze nella struttura dell'LPS possono contribuire notevolmente all'esito delle risposte TLR4 in diverse specie di mammiferi.

Risposte cellulari specifiche per gli equini alla flagellina

Come descritto in precedenza, la flagellina, il ligando del TLR5, induce risposte proinfiammatorie nei neutrofili equini.¹⁴ Tuttavia, la flagellina non attiva i monociti del sangue periferico equino, poiché l'espressione del TLR5 superficiale in queste cellule è estremamente bassa.¹⁴ Al contrario, i monociti di tutti i altre specie di mammiferi (ad esempio, esseri umani, topi, bovini) studiate fino ad oggi rispondono fortemente alla flagellina e lo fanno attraverso il TLR5.¹⁴ Questa scoperta fornisce ulteriore supporto all'idea che le risposte immunitarie innate cellulari ai PAMP nei cavalli sono diverse da quelle di altri animali

Nota:

Aspetti importanti delle risposte del sistema innato equino

- Sensibilità estremamente elevata delle cellule equine all'LPS
- La SIRS non è associata solo alla stimolazione LPS; si verifica con organismi gram-positivi (ad esempio, *Requi*)
- La stimolazione LPS dei monociti equini coinvolge selettivamente la via MyD88, con conseguenti effetti proinfiammatori
- I composti che funzionano come antagonisti dell'LPS in altre specie attivano le cellule equine
- Nei cavalli la flagellina attiva selettivamente i neutrofili, non i monociti

4.9 Il Focus sull'endotossiemia

L'attenzione alle endotossine non è nuova. In effetti, le endotossine sono state al centro degli studi fin dagli inizi del 1890, quando Richard Pfeiffer, un collega di Robert Koch in Germania, identificò “tossine legate alla sostanza corporea batterica” termostabili che causavano shock circolatorio e morte negli animali da laboratorio.³⁶ Prima della fine di quel decennio, Coley³⁷ riportò l'attività “antitumorale” associata alle infezioni e iniziò studi clinici utilizzando una combinazione di organismi batterici. Queste tossine furono somministrate a pazienti affetti da cancro negli Stati Uniti dall'inizio degli anni '20 fino al 1963. L'interesse per le endotossine aumentò negli anni '40, quando fu stabilito che le tossine termostabili erano, in effetti, LPS, e divenne possibile purificare ricavarli dai surnatanti delle colture batteriche. Durante questo periodo i campi della chimica, della biochimica e dell'immunologia iniziarono a sovrapporsi e furono condotti studi in cui gli effetti in vivo dell'LPS furono caratterizzati in modo più completo, fu identificato il fenomeno della tolleranza alle endotossine e la struttura del lipide A.³⁶ Durante tutto questo periodo si presumeva che la natura ricca di lipidi delle endotossine permettesse loro in qualche modo di intercalarsi nelle membrane cellulari e causare danni all'ospite. Nello stesso periodo una scoperta molto importante ricevette relativamente poca attenzione, vale a dire che era stato prodotto un ceppo di topi che aveva provocato l'ereditarietà della resistenza alla somministrazione sperimentale di endotossine.³⁸ Chiaramente questa scoperta avrebbe dovuto indurre più ricercatori a considerare altri meccanismi attraverso i quali LPS interagisce con le cellule. Tuttavia, il concetto di endotossine come “tossine” che da sole danneggiano le cellule ospiti era radicato nella letteratura e l'attenzione sull'endotossiemia

era forte.

A metà degli anni '60 Carroll, Schalm e Wheat eseguirono il primo studio valutando gli effetti dell'endotossina in un singolo cavallo, seguito negli anni '70 da una serie di studi in cui furono valutati diversi dosaggi e vie di somministrazione di LPS nei pony.³⁹ Le concentrazioni di LPS utilizzate in questi studi (180 mg/kg) sono state estrapolate da quelle utilizzate in altre specie e sono risultate eccessive. A questi studi ne sono seguiti altri in cui sono stati valutati dosaggi molto più bassi di LPS, nel tentativo di simulare più da vicino gli effetti dell'endotossemia identificati nei pazienti clinici con malattie gastrointestinali. Per necessità, l'obiettivo di questi primi studi era quello di caratterizzare gli effetti dell'endotossiemia sperimentale, documentando principalmente le risposte cardiopolmonari che si verificavano come risultato della somministrazione di LPS, sia come iniezione in bolo o infusione lenta somministrata per via endovenosa, sia come iniezione singola o iniezioni intermittenti somministrate per via intraperitoneale.

Alla fine degli anni '70, due cose accaddero contemporaneamente e cambiarono il modo in cui venivano condotti questi studi: in primo luogo, la scoperta del metabolismo dell'acido arachidonico e del ruolo delle prostaglandine nel dolore e nell'infiammazione, e in secondo luogo, il rilascio di flunixin meglumine come analgesico per i cavalli con colica. La combinazione di queste due scoperte ha reso possibile la realizzazione che gli effetti negativi delle endotossine non erano dovuti alle endotossine stesse ma erano il risultato della risposta del corpo. Queste scoperte sono state seguite abbastanza da vicino dallo sviluppo di *test* radioimmunologici che hanno permesso ai ricercatori di monitorare i cambiamenti nelle concentrazioni plasmatiche dei metaboliti stabili dei singoli metaboliti dell'acido arachidonico in risposta alla somministrazione di LPS e gli effetti della flunixin meglumine su di esso. La disponibilità di questi *test* ha permesso di riconoscere quali risposte fisiologiche all'LPS erano associate al metabolismo dell'acido arachidonico e quali no.

Negli anni '80 l'attenzione della comunità di ricerca si spostò rapidamente dal metabolismo dell'acido arachidonico al TNF. Inizialmente si pensava che esistessero come 2 fattori correlati sintetizzati dai macrofagi, chiamati TNFa e TNFb, ora è noto che ci sono 19 membri della superfamiglia delle citochine del TNF che

sono coinvolte nell'infiammazione, nella proliferazione cellulare e nell'apoptosi.⁴⁰ Una volta diventato possibile rilevare il TNFa nei campioni di siero, questo è diventato l'obiettivo principale del lavoro sull'endotossemia sperimentale e nei casi clinici di coliche.⁴¹

Il decennio successivo di ricerca si concentrò in gran parte sull'identificazione e la caratterizzazione delle interleuchine, una vasta famiglia di citochine che aiuta ad avviare e modulare le risposte cellulari durante l'infiammazione e le risposte del sistema immunitario, e sul fattore tissutale, una risposta della superficie cellulare all'LPS che fagociti mononucleati direttamente collegati alla cascata della coagulazione. La disponibilità di test di laboratorio per rilevare questi mediatori dell'infiammazione ha permesso di monitorare gli effetti dell'endotossiemia sperimentale e di caratterizzare il loro ruolo nei cavalli con coliche.⁴² Durante questo periodo, sono stati condotti ulteriori studi su cavalli utilizzando infusioni a breve termine, di dosi molto più piccole di LPS (30 ng/kg) nel tentativo di indurre risposte fisiologiche che imitino più da vicino quelle osservate nei casi clinici.⁴³

Nel 1997, Janeway, Medzhitov e Beutler hanno esteso ai mammiferi il precedente lavoro di Hoffman sul ruolo dei recettori di pedaggio nelle infezioni fungine nei moscerini della frutta, e così facendo hanno cambiato il panorama della ricerca sulle infezioni e sull'immunità. Questi ricercatori hanno identificato TLR4 e hanno dimostrato che funziona come recettore sulla superficie cellulare per LPS. Il lavoro successivo, in gran parte condotto da Akira, ha portato all'identificazione della maggior parte dei membri della famiglia di recettori TLR qui descritti. Inoltre, Hoshino e colleghi⁴⁴ determinarono presto che il ceppo di topi resistenti all'LPS descritto circa 50 anni prima aveva una mutazione nel gene TLR4 che spiegava la loro mancanza di risposta all'LPS.

La complessità della risposta dell'ospite all'LPS è stata recentemente chiarita attraverso l'uso della reazione a catena della polimerasi-trascrizione inversa quantitativa. Invece di monitorare i cambiamenti nelle concentrazioni circolanti di alcuni mediatori dell'infiammazione, questo approccio rende possibile monitorare simultaneamente i cambiamenti nell'espressione di una varietà di geni nelle cellule. Questo approccio è stato utilizzato per valutare la risposta delle cellule isolate da cavalli con coliche e cavalli dopo sovraccarico di carboidrati nel tratto gastrointestinale.^{45,46}

4.10 Rilevamento dei LPS

Negli anni '70 Bang e Levin svilupparono il primo test di laboratorio che consentiva di rilevare piccole quantità di endotossine nei fluidi corporei. Questo test è nato dagli studi che Bang stava eseguendo sulla circolazione dell'emolinfa nel granchio a ferro di cavallo, *Limulus polyphemus*. Durante uno dei suoi studi, uno dei granchi morì a causa di un'infezione causata da un organismo *Vibrio*, e uno dei risultati principali fu che essenzialmente tutta l'emolinfa del granchio si era coagulata. Questa scoperta ha portato a una serie di studi culminati nella determinazione da parte dei 2 studiosi che gli stessi effetti sull'emolinfa potevano essere prodotti con endotossine isolate da batteri gram-negativi e nello sviluppo del test del lisato di *amebociti* *Limulus*. I successivi miglioramenti a questo test che hanno incorporato l'uso di un substrato cromogenico ora consentono la rilevazione di concentrazioni estremamente piccole di endotossina nel plasma. I risultati di numerosi studi clinici condotti utilizzando questo test indicano che circa il 30% dei cavalli adulti con coliche e il 50% dei puledri neonatali critici presentati a ospedali universitari veterinari hanno LPS in circolo.⁴⁷⁻⁴⁹ Quando viene rilevato LPS, generalmente è presente nei cavalli con malattie che hanno nella patogenesi o infiammazione o ischemia. In uno studio, la probabilità che l'LPS venisse rilevato nella circolazione era significativamente più alta per i cavalli con tachicardia, aumento del volume delle cellule imballate e risultati clinici di malattia/chirurgia tipicamente associati alla traslocazione di LPS dal tratto gastrointestinale alla circolazione.⁴⁹ Il potenziale contributo di altri PAMP allo sviluppo della SIRS nei cavalli non è stato studiato. Negli esseri umani, è stato rilevato DNA batterico nella circolazione di pazienti affetti da SIRS.⁵⁰ Analogamente, la somministrazione di flagellina ai topi provoca una forma grave di infiammazione polmonare acuta e sia la flagellina che gli anticorpi diretti contro la flagellina sono stati rilevati in campioni di siero provenienti da pazienti umani con malattia di Crohn.⁵¹⁻⁵³

4.11 SIRS o endotosseмия?

Sebbene il termine endotosseмия sembri essere saldamente radicato nel lessico veterinario, i dati indicano che i segni clinici associati alle malattie infiammatorie o ischemiche sono in definitiva

il risultato dei mediatori infiammatori sintetizzati dalle cellule del cavallo piuttosto che dalla presenza di endotossine in circolo. Questa conclusione è ulteriormente supportata da segni clinici simili che possono essere evidenti in animali con infezioni causate da batteri Gram-positivi (ad esempio, *R. equi*), e dalla probabilità che componenti batterici diversi dall'LPS entrino in circolo in animali con infiammazione intestinale o ischemia, come mostrato negli esseri umani. Pertanto, SIRS sarebbe un termine più accurato per descrivere ciò che molti ora chiamano endotossiemia clinica. È importante, tuttavia, tenere presente che le concentrazioni di LPS richieste per avviare risposte infiammatorie sistemiche nelle cellule del cavallo sono ordini di grandezza inferiori a quelle richieste per altri componenti batterici, e l'impatto dell'LPS sullo stato dell'animale non può essere trascurato.

4.12 Trattamento

Approccio terapeutico attuale

Al momento, i pilastri del trattamento dei cavalli e dei puledri sono la sostituzione dei liquidi per via endovenosa, i farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS) e la polimixina B.⁵⁴ Altri approcci terapeutici sono stati utilizzati, ma mancano di dati derivati sperimentalmente per supportarne l'uso continuato o sono stati sostituiti da altre terapie. Questi includono anticorpi contenenti plasma diretti contro la porzione lipidica A dell'LPS, dimetilsolfossido, eparina e pentossifillina.

Più comunemente, per la fluidoterapia vengono utilizzate soluzioni isotoniche di elettroliti poli-ionici; in alcuni casi, in particolare per l'uso a lungo termine, viene fornito ulteriore potassio aggiungendo KCl alla soluzione. Quando richiesto dalla gravità della malattia, il rapido ripristino del volume del fluido circolante può essere facilitato dalla somministrazione di soluzione salina ipertonica, e i colloidi possono essere utilizzati per aiutare a trattenere i liquidi all'interno dello spazio vascolare negli animali ipoproteinemici.

Sulla base della loro capacità di prevenire la produzione di prostaglandine inibendo il metabolismo dell'acido arachidonico, i FANS sono comunemente usati negli animali affetti. L'agente più comunemente utilizzato è il flunixin meglumine, che spesso viene somministrato a dosi di 0,25 mg/kg o 1,1 mg/kg. Il razionale per

l'uso della dose più bassa si basa su uno studio iniziale in cui molti degli effetti negativi della somministrazione sperimentale di endotossine sono stati prevenuti da questa dose, e sulla preoccupazione di mascherare potenzialmente i segni clinici associati all'ischemia intestinale all'inizio. dose più elevata. Poiché la dose più elevata raccomandata dal produttore previene ulteriori effetti dell'LPS, molti medici preferiscono somministrare questa dose a intervalli di 12 ore.

L'antimicrobico polipeptidico cationico, la polimixina B, si lega avidamente alla porzione lipidica A dell'LPS. Per questo motivo è stato studiato sperimentalmente nei cavalli a cui è stato somministrato LPS e spesso viene somministrato ad animali ad aumentato rischio di traslocazione di LPS attraverso l'intestino danneggiato o che presentano segni di SIRS. Nei casi clinici viene utilizzata un'ampia gamma di dosi, molto spesso pari o vicine alle 5000 U/kg utilizzate in uno studio in vivo sull'endotossiemia sperimentale.⁴³ È ragionevole mettere in dubbio l'efficacia di questa terapia una volta presenti segni di SIRS.

Interpretazione dei risultati dei trattamenti traslazionali

Gli studi medici traslazionali devono essere interpretati con cautela. Ciò che è buono per una specie non è necessariamente buono per un'altra o, in questo caso, ciò che funziona bene in una specie può avere effetti negativi nel cavallo. Questo punto di vista è suffragato dalle scoperte che i composti naturali e sintetici a base di lipide A funzionano come antagonisti dell'LPS negli esseri umani, ma come agonisti nei cavalli.³⁴ Allo stesso modo, il fatto che i cambiamenti nell'espressione genica durante la SIRS sono diversi nei topi e nei cavalli. gli esseri umani possono spiegare perché molti farmaci sviluppati per il trattamento della SIRS sulla base di studi condotti sui topi non riescono a produrre effetti benefici negli studi clinici sull'uomo.⁵⁵ Di conseguenza, i farmaci che sono efficaci negli studi condotti su animali da laboratorio potrebbero non avere un risultato positivo per la gestione della SIRS nei cavalli.

4.13 Bibliografia

1. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest* 1992;101: 1644–55.
2. Corley KT, Donaldson LL, Furr MO. Arterial lactate concentration, hospital survival, sepsis and SIRS in critically ill neonatal foals. *Equine Vet J* 2005;37: 53–9.
3. Epstein KL, Brainard BM, Gomez-Ibanez SE, et al. Thrombelastography in horses with acute gastrointestinal disease. *J Vet Intern Med* 2011;25(2):307–14.
4. Belknap JK, Black SJ. Sepsis-related laminitis. *Equine Vet J* 2012;44:738–40.
5. Giguere S, Cohen ND, Chaffin MK, et al. *Rhodococcus equi*: Clinical manifestations, virulence and immunity. *J Vet Intern Med* 2011;25:1221–30.
6. Werners AH, Bryant CE. Pattern recognition receptors in equine endotoxaemia and sepsis. *Equine Vet J* 2012;44:490–8.
7. Bryant CE, Monie TP. Mice, men and the relatives: cross-species studies underpin innate immunity. *Open Biol* 2012;2(4):120015.
8. Astakhova NM, Perelygin AA, Zharkikh AA, et al. Characterization of equine and other vertebrate TLR3, TLR7, and TLR8 genes. *Immunogenetics* 2009;61: 529–39.
9. Gornik K, Moore P, Figueiredo M, et al. Expression of Toll-like receptors 2, 3, 4, 6, 9, and MD-2 in the normal equine cornea, limbus, and conjunctiva. *Vet Ophthalmol* 2011;14:80–5.
10. Lohmann KL, Vandenplas ML, Barton MH, et al. The equine TLR4/MD-2 complex mediates recognition of lipopolysaccharide from *Rhodobacter sphaeroides* as an agonist. *J Endotoxin Res* 2007;13(4):235–42.
11. Zhang YW, Davis EG, Blecha F, et al. Molecular cloning and characterization of equine Toll-like receptor 9. *Vet Immunol Immunopathol* 2008;124:209–19.
12. Quintana AM, Landolt GA, Annis KM, et al. Immunological characterization of the equine airway epithelium and of a primary equine airway epithelial cell culture model. *Vet Immunol Immunopathol* 2011;140:226–36.
13. Figueiredo MD, Vandenplas ML, Hurley DJ, et al. Differential induction of MyD88- and TRIF-dependent pathways in equine monocytes by Toll-like receptor agonists. *Vet Immunol Immunopathol* 2009;127:125–34.
14. Kwon S, Gewirtz AT, Hurley DJ, et al. Disparities in TLR5 expression and responsiveness to flagellin in equine neutrophils and mononuclear phagocytes. *J Immunol* 2011;186:6263–70.
15. Flaminio MJ, Borges AS, Nydam DV, et al. The effect of CpG-ODN on antigen presenting cells of the foal. *J Immune based Therap Vacc* 2007;5:1.
16. Trent MS, Stead CM, Tran AX, et al. Diversity of endotoxin and its impact on pathogenesis. *J Endotoxin Res* 2006;12:205–23.
17. Schumann RR. Old and new findings on lipopolysaccharide-binding protein: a soluble pattern-recognition molecule. *Biochem Soc Trans* 2011;39:989–93.
18. Szatmary Z. Molecular biology of toll-like receptors. *Gen Physiol Biophys* 2012; 31:357–66.
19. Brikos C, O'Neill LA. Signalling of toll-like receptors. *Handb Exp Pharmacol* 2008;(183):21–50.
20. Siegemund S, Sauer K. Balancing pro- and anti-inflammatory TLR4 signaling. *Nat Immunol* 2012;13:1031–3.
21. Aksoy E, Taboubi S, Torres D, et al. The p110d isoform of the kinase PI(3)K controls the subcellular compartmentalization of TLR4 signaling and protects from endotoxic shock. *Nat Immunol* 2012;13:1045–54.
22. Darrah PA, Monaco MC, Jain S, et al. Innate immune responses to *Rhodococcus equi*. *J Immunol* 2004;173:1914–24.
23. Cheevers WP, Archer BG, Crawford TB. Characterization of RNA from equine infectious anemia virus. *J Virol* 1977;24:489–97.
24. Lambert AJ, Martin DA, Lanciotti RS. Detection of North American Eastern and Western equine encephalitis viruses by nucleic acid amplification assays. *J Clin Microbiol*

- 2003;41(1):379–85.
25. Mottahedin A, Paidikondala M, Cholleti H, et al. NF- κ B activation by equine arteritis virus is MyD88 dependent and promotes viral replication. *Arch Virol* 2013;158(3):701–5.
 26. Rahman MM, McFadden G. Modulation of NF- κ B signaling by microbial pathogens. *Nat Rev Microbiol* 2011;9:291–306.
 27. Wilson JR, de Sessions PF, Leon MA, et al. West Nile virus nonstructural protein 1 inhibits TLR3 signal transduction. *J Virol* 2008;82(17):8262–71.
 28. Liu J, Xu C, Hsu LC, et al. A five-amino-acid motif in the undefined region of the TLR8 ectodomain is required for species-specific ligand recognition. *Mol Immunol* 2010;47:1083–90.
 29. Liu M, Liu T, Bordin A, et al. Activation of foal neutrophils at different ages by CpG oligodeoxynucleotides and *Rhodococcus equi*. *Cytokine* 2009;48:280–9.
 30. Sun WC, Moore JN, Hurley DJ, et al. Effects of stimulation of adenosine A2A receptors on lipopolysaccharide-induced production of reactive oxygen species by equine neutrophils. *Am J Vet Res* 2007;68:649–56.
 31. Biswas SK, Lopez-Collazo E. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol* 2009;30:475–87.
 32. Kwon S, Vandenplas ML, Figueiredo MD, et al. Differential induction of Toll-like receptor gene expression in equine monocytes activated by Toll-like receptor ligands or TNF- α . *Vet Immunol Immunopathol* 2010;138:213–7.
 33. Walsh C, Gangloff M, Monie T, et al. Elucidation of the MD-2/TLR4 interface required for signaling by lipid IVA. *J Immunol* 2008;181:1245–54.
 34. Bryant CE, Ouellette A, Lohmann K, et al. The cellular Toll-like receptor 4 antagonist E5531 can act as an agonist in horse whole blood. *Vet Immunol Immunopathol* 2007;116:182–9.
 35. Figueiredo MD, Moore JN, Vandenplas ML, et al. Effects of the second-generation synthetic lipid A analogue E5564 on responses to endotoxin in [corrected] equine whole blood and monocytes. *Am J Vet Res* 2008;69:796–803.
 36. Reitschel ET, Cavaillon JM. Richard Pfeiffer and Alexandre Besredka: creators of the concept of endotoxin and anti-endotoxin. *Microbes Infect* 2003;5:1407–14.
 37. Coley WB. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas, with a report of ten original cases. *Am J Med Sci* 1893;105:487–511.
 38. Hill AB, Hatswell JM, Topley WW. The inheritance of resistance, demonstrated by the development of a strain of mice resistant to experimental inoculation with a bacterial endotoxin. *J Hyg* 1940;40:538–47.
 39. Burrows GE. Endotoxemia induced by rapid intravenous injection of *Escherichia coli* in anesthetized ponies. *Am J Vet Res* 1970;31:1967–73.
 40. Aggarwal BB, Gupta SC, Kim JH. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood* 2012;119: 651–65.
 41. MacKay RJ. Association between serum cytotoxicity and selected clinical variables in 240 horses admitted to a veterinary hospital. *Am J Vet Res* 1992;53(5): 748–52.
 42. Collatos C, Barton MH, Prasse KW, et al. Intravascular and peritoneal coagulation and fibrinolysis in horses with acute gastrointestinal tract diseases. *J Am Vet Med Assoc* 1995;207:465–70.
 43. Barton MH, Parvianien A, Norton N. Polymyxin B protects horses against induced endotoxemia in vivo. *Equine Vet J* 2004;36:397–401.
 44. Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, et al. Cutting Edge: Toll-like receptor 4 deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the LPS gene product. *J Immunol* 1999;162:3749–52.
 45. Lopes MA, Salter CE, Vandenplas ML, et al. Expression of inflammation-associated genes in circulating leukocytes collected from horses with gastrointestinal tract disease. *Am J Vet Res* 2010;71:915–24.
 46. Leise BS, Faleiros RR, Watts M, et al. Laminar inflammatory gene expression in the carbohydrate overload model of equine laminitis. *Equine Vet J* 2011;43:54–61.

47. Barton MH, Morris DD, Norton N, et al. Hemostatic and fibrinolytic indices in neonatal foals with presumed septicemia. *J Vet Intern Med* 1998;12:26–35.
48. Steverink P, Sturk A, Rutten V, et al. Endotoxin, interleukin-6 and tumor necrosis factor concentrations in equine acute abdominal disease – relation to clinical outcome. *J Endotoxin Res* 1995;2:289–99.
49. Senior JM, Proudman CJ, Leuwer M, et al. Plasma endotoxin in horses presented to an equine referral hospital: correlation to selected clinical parameters and outcomes. *Equine Vet J* 2011;43:585–91.
50. Kane TD, Alexander JW, Johannigman JA. The detection of microbial DNA in the blood: a sensitive method for diagnosing bacteremia and/or bacterial translocation in surgical patients. *Ann Surg* 1998;227:1–9.
51. Liaudet L, Szabo C, Evgenov OV, et al. Flagellin from gram-negative bacteria is a potent mediator of acute pulmonary inflammation in sepsis. *Shock* 2003;19: 131–7.
52. Sitaraman SV, Klapproth JM, Moore DA 3rd, et al. Elevated flagellin-specific immunoglobulins in Crohn's disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288:G403–6.
53. Lodes MJ, Cong Y, Elson CO, et al. Bacterial flagellin is a dominant antigen in Crohn disease. *J Clin Invest* 2004;113:1296–306.
54. Sykes BW, Furr MO. Equine endotoxaemia – a state-of-the-art review of therapy. *Aust Vet J* 2005;83:45–50.
55. Seok J, Warren HS, Cuenca AG, et al. Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110:3507–12.

5- LA PROTEOMICA

Il termine proteomica si riferisce allo studio delle proteine, comprese le loro strutture e funzioni, mentre il proteoma può essere definito come l'insieme di proteine espresse dal materiale genetico di un organismo in condizioni ambientali definite.¹ La proteomica è emersa come campo di ricerca in meno di due decenni² e si è sviluppata rapidamente, spinta dai miglioramenti tecnologici e dalla necessità di approcci analitici in grado di fornire una caratterizzazione proteica globale. La capacità di sequenziare interi genomi e di raccogliere i dati risultanti in sequenze genomiche ha generato la proteomica, ma la caratterizzazione globale delle proteine che compongono i sistemi biologici anche semplici non è ancora realizzabile.³ Un proteoma è generalmente più complesso del genoma codificante, e le proteine sono presenti in un ampio intervallo dinamico.⁴ Questi problemi sono aggravati dalla regolazione dell'espressione proteica, in risposta a stimoli ambientali e di sviluppo, che si traduce in un proteoma dinamico. Tuttavia, l'importanza delle proteine come molecole effettrici primarie della biologia, che rappresentano anche i principali bersagli farmacologici ed antigenici, ha promosso un forte interesse nel settore e di conseguenza numerosi investimenti con un continuo sviluppo delle conoscenze.

La proteomica prevede la definizione di una complessa miscela di proteine in componenti che possono poi essere caratterizzati ed analizzati. Essa implica sempre l'associazione della proteina al gene codificante (identificazione), ma può anche comportare la quantificazione relativa o un'ulteriore caratterizzazione per rivelare la modificazione proteica post-traduzionale. La caratterizzazione delle proteine viene eseguita mediante spettrometri di massa dopo un frazionamento iniziale. Quest'ultimo è determinato dalla complessità del proteoma e dalla specifica domanda della ricerca, ma deve essere compatibile con la spettrometria di massa o *mass spectrometry* (MS). Attualmente, per la proteomica vengono impiegate 2 principali piattaforme MS, differenziate per il meccanismo attraverso il quale vengono generati gli ioni: queste

sorgenti ioniche sono denominate desorbimento/ionizzazione laser assistito da matrice o *matrix-assisted laser desorption/ionization* (MALDI) e ionizzazione elettrospray o *electrospray ionization* (ESI). Gli strumenti MALDI ricevono gli analiti allo stato solido, mentre il campione viene consegnato agli strumenti ESI in un solvente volatile. Queste diverse piattaforme presentano vantaggi e svantaggi ma sono complementari e la maggior parte dei laboratori di proteomica utilizzerà entrambi i sistemi. Qualunque sia il sistema MS utilizzato, l'obiettivo ottimale è fornire peptidi come popolazioni omogenee che possano essere caratterizzate senza competizione proveniente da altri peptidi, polimeri o sali. Dato che anche i semplici proteomi dei procarioti comprendono migliaia di proteine e le specie multicellulari possono comprendere più di 100.000 proteine, si tratta di un compito arduo e richiede un ampio frazionamento del campione.⁴

I sistemi di frazionamento proteico impiegati in proteomica sono elettroforetici o cromatografici: il primo è tipicamente applicato a proteine intatte e il secondo a peptidi generati dalla scissione proteica. Gli approcci di separazione ortogonale sono spesso utilizzati per migliorare la risoluzione e l'archetipo della separazione ortogonale in proteomica è l'elettroforesi bidimensionale o *2-dimensional electrophoresis* (2DE)⁵ La 2DE convenzionale prevede la separazione mediante focalizzazione isoelettrica nella prima dimensione, seguita dall'elettroforesi con sodio dodecil solfato nella seconda; entrambe le dimensioni vengono eseguite in una matrice di gel di poliacrilammide e le proteine migrano su gel bidimensionali come punti in base al punto isoelettrico e al peso molecolare apparente. La mappa risultante, che può essere visualizzata mediante colorazione delle proteine, può risolvere diverse migliaia di specie proteiche e le macchie possono essere asportate direttamente dal gel per la caratterizzazione mediante MS.

La 2DE è un approccio importante per l'analisi descrittiva e comparativa del proteoma, poiché rimane l'approccio di separazione delle proteine con la massima risoluzione ed è intrinsecamente quantitativo. La separazione delle proteine intatte per carica e massa può evidenziare modifiche post-traduzionali che non sarebbero evidenti nell'elettroforesi unidimensionale o nelle separazioni basate

su peptidi.⁶ La 2DE tende a sotto rappresentare alcune classi di proteine, comprese quelle che hanno un'abbondanza relativamente bassa, molto grande o molto carico. Alcuni di questi problemi possono essere aggirati mediante pre-frazionamento per arricchire le proteine di interesse o concentrando la 2DE su specifici intervalli di carica e/o massa. Proteine molto idrofobiche possono essere refrattarie alla solubilizzazione nelle condizioni non ioniche richieste per la focalizzazione isoelettrica e detergenti alternativi o separazioni bidimensionali, come il sistema BAC/SDS-PAGE,^{7,8} si sono dimostrati utili in questo contesto. Tuttavia, il 2DE è spesso considerato un approccio dispendioso in termini di tempo e tecnicamente impegnativo che presenta vantaggi limitati rispetto ai metodi cromatografici più facilmente automatizzati.

L'eterogeneità delle proteine intatte, sfruttata in 2DE, limita la risoluzione della cromatografia per i flussi di lavoro proteomici. Invece, le proteine vengono tipicamente frammentate in peptidi prima della separazione cromatografica. La separazione cromatografica dei peptidi in fase inversa è ideale per la proteomica perché i peptidi possono essere intrappolati e dissalati prima dell'eluizione e perché la fase mobile comprende solventi volatili che possono essere evaporati nella sorgente ESI. La cromatografia può quindi essere accoppiata direttamente all'ESI-MS, facilitando l'automazione e riducendo al minimo la perdita di campione. La separazione cromatografica multidimensionale è sempre più impiegata⁹ perché può essere automatizzata e perché anche le proteine altamente cariche o idrofobe genereranno probabilmente alcuni peptidi suscettibili all'analisi MS. Lo scambio ionico viene utilizzato principalmente come prima dimensione, fornendo una separazione basata su caratteristiche biofisiche ortogonali alla cromatografia in fase inversa e sfruttando quest'ultima per dissalare le frazioni di scambio ionico prima della MS. Gli approcci cromatografici possono essere più sensibili dell'elettroforesi perché non è necessario recuperare proteine o peptidi da una matrice di gel. Tuttavia, la conversione di ciascuna proteina di un proteoma complesso in un gran numero di peptidi è controproducente quando l'obiettivo è massimizzare la copertura proteomica, perché ci sono

limiti alla risoluzione della cromatografia peptidica multidimensionale; quindi, il pre-frazionamento o il materiale proteomico sono spesso necessari. Le combinazioni di elettroforesi e cromatografia sono tra i sistemi di frazionamento più efficienti,¹⁰ ma approcci mirati come il frazionamento subcellulare o la purificazione per affinità di complessi proteici possono comportare una copertura notevolmente migliorata di un sotto-proteoma.

Tipicamente, le proteine verranno ottenute da una fonte biologica e frazionate mediante elettroforesi. Le frazioni proteiche verranno quindi tripsinizzate per generare peptidi che possono essere ulteriormente frazionati mediante cromatografia liquida ad alte prestazioni o *liquid chromatography* (LC) prima dell'analisi mediante un ESI-MS alimentato direttamente con l'eluato cromatografico (LC-MS). La MS sarà generalmente in grado di registrare la massa di analiti e di isolare e frammentare gli ioni peptidici (MS/MS o tandem MS) per generare informazioni sulla struttura.³ I dati risultanti vengono inviati a un motore di ricerca, come Mascot (Matrix Science Ltd), che genera dati MS in silico per il database di sequenze del genoma specificato e cerca corrispondenze statisticamente significative con i dati MS generati sperimentalmente. L'*output* dei dati è tipicamente un elenco di potenziali corrispondenze, classificate in base alla confidenza, con le proteine che possono essere componenti del campione. È importante riconoscere che questo non sarà un elenco completo dei componenti proteici, soprattutto perché alcuni saranno presenti a livelli inferiori alla soglia di rilevamento, ma anche perché alcune proteine sono refrattarie all'analisi o non sono rappresentate nel database del genoma. Si tratta anche di un set di dati qualitativi, ma i dati quantitativi sono spesso desiderabili.

La quantificazione assoluta delle proteine è difficile da intraprendere in un contesto “-omico”, ma la quantificazione relativa può essere ottenuta mediante una varietà di approcci comparativi. La quantificazione relativa delle proteine intatte viene generalmente eseguita mediante metodi basati su gel, come la 2DE mediante colorazione semiquantitativa delle proteine, o strategie di marcatura delle proteine, come l'elettroforesi differenziale su gel o *difference gel electrophoresis* (DiGE).¹¹ L'avvento della tecnologia DiGE ha

notevolmente migliorato l'utilità della 2DE. per l'analisi proteomica quantitativa, consentendo il confronto diretto su un singolo gel di campioni che sono etichettati in modo differenziale da fluorofori che sono abbinati in massa e carica ma spettralmente discreti. Ad esempio, il DiGE è stato sfruttato per rivelare cambiamenti nell'espressione di isoforme distinte della triparedossina perossidasi in ceppi virulenti e attenuati di *Leishmania*.¹² La quantificazione a livello peptidico può essere ottenuta mediante approcci di marcatura degli isotopi stabili o mediante confronto senza etichetta. Le proteine isolate o i peptidi triptici possono essere marcati chimicamente prima della separazione [iTRAQ]¹³, marcatura con dimetile,¹⁴ e una miriade di altri approcci,³ oppure le proteine possono essere marcate metabolicamente con amminoacidi pesanti e leggeri (marcatura di isotopi stabili con amminoacidi in coltura o *stable isotope labeling with amino acids in culture* [SILAC])¹⁵ Tutti questi approcci di etichettatura comportano la miscelazione di campioni per il confronto dopo l'etichettatura ma prima della separazione e dell'analisi MS. L'abbondanza relativa di proteine specifiche in ciascun campione viene deconvoluta dai dati MS risultanti, utilizzando un software appropriato. Tra gli approcci di etichettatura delle proteine, SILAC è interessante perché l'etichetta viene incorporata durante la crescita, evitando la possibilità di introdurre cambiamenti artefatti nell'abbondanza proteica durante la fase di preparazione del campione. Tuttavia, la marcatura SILAC può essere eseguita solo in sistemi biologici che sono auxotrofi per gli amminoacidi forniti come etichette, mentre la marcatura chimica delle proteine può essere eseguita con proteine provenienti da qualsiasi fonte.

Gli approcci senza etichetta, che comportano l'analisi LC-MS seriale di più campioni non etichettati, stanno diventando comuni poiché la separazione cromatografica migliora e facilita l'allineamento dei set di dati che è essenziale per il confronto. Gli approcci senza etichetta sono più costosi in termini di tempo strumentale, poiché i campioni senza etichetta non possono essere sottoposti a multiplexing: una considerazione importante, poiché la manutenzione della strumentazione LC-MS è costosa.

Indipendentemente dall'approccio quantitativo, gli esperimenti di proteomica comparativa hanno il potenziale per evidenziare proteine chiave nei fenotipi di interesse¹⁶ e quindi hanno un enorme potenziale per evidenziare bersagli farmacologici e biomarcatori e chiarire i meccanismi biologici.

5.1 La Proteomica in Medicina Ippiatrica

La tecnologia “-omica” sta velocemente migliorando la nostra conoscenza del mondo molecolare e fornito informazioni affascinanti sulla composizione e le funzioni di questi componenti in una vasta gamma di diverse specie animali. In particolare, in medicina equina, hanno aumentato la comprensione dei cambiamenti molecolari in alcune patologie e stanno contribuendo allo sviluppo di *test* diagnostici basati su *biomarker* specifici. Sebbene questo entusiasmante campo sia ancora agli inizi per la medicina applicata al cavallo è probabile che avrà un impatto significativo nei prossimi anni. Ad oggi, la letteratura riporta l'applicazione di questa tecnica in un numero molto limitato di patologie e/o sindromi che coinvolgono diversi apparati o organi i. Una breve ricapitolazione è riportata di seguito.

Uveite ricorrente equina e disturbi articolari

L'impiego della proteomica è stato applicato a due importanti e tipiche malattie del cavallo, quali l'uveite ricorrente e l'osteoartrosi/osteocondrosi. In un modello sperimentale *ex vivo* Hauck e coll.nel 2012 hanno studiato alcune proteine implicate nel processo infiammatorio della cartilagine articolare, fornendo una prospettiva approfondita sulla patogenesi molecolare dell'artrite equina e dimostrando come il trattamento con IL-1 moduli l'espressione delle metalloproteinasi-1 e -3 della matrice.¹⁷ Un altro interessante studio sull'uveite ricorrente, ha messo in evidenza come l'istochimica classica possa essere integrata con le tecniche proteomiche. In un'analisi LC-MS/MS label-free del vitreo affetto da uveite, oltre a un aumento delle proteine coinvolte nella cascata del complemento, è stata osservata una diminuzione significativa delle proteine coinvolte nella via di segnalazione Wnt (cioè DKK3 e SFRP2).¹⁸ L' Analisi *Western blotting* ha permesso la quantificazione della diversa espressione delle 2 proteine, mentre l'immunoistochimica ha integrato i risultati della proteomica

localizzando l'espressione delle 2 proteine su campioni retinali. I principali risultati immunohistochimici includono una specifica *downregulation* di SFRP2 nella membrana limitante esterna della retina e una diminuzione generale di DKK3, che è stato dimostrato localizzarsi con le cellule gliali di Müller. Pertanto, accoppiando la proteomica, il *Western blotting* quantitativo e l'immunohistochimica, questo studio non solo ha dimostrato il coinvolgimento della via Wnt nell'uveite equina, ma lo ha anche caratterizzato a livello tissutale in zone in cui il modello di espressione di queste proteine è maggiormente modificato.

Oltre a confrontare diversi livelli di proteine tra gruppi sani e malati, gli approcci proteomici possono essere applicati anche per l'identificazione e la quantificazione di peptidi e neo-epitopi (bersagli del sistema immunitario). Skiöldebrand e collaboratori nel 2017¹⁹ hanno studiato i biomarcatori precoci dell'osteoartrosi nel liquido sinoviale equino.²⁰ A causa della lenta insorgenza di questa condizione, al momento della diagnosi è possibile osservare già una situazione avanzata e quindi è necessario sviluppare biomarcatori affidabili e specifici di malattia capaci di identificare stati precoci in modo da consentire un intervento terapeutico tempestivo.²¹⁻²³ Durante la patogenesi dell'osteoartrosi, l'aumento delle attività enzimatiche delle metalloproteinasi della matrice, della disintegrina A, della metalloproteinasi con trombospodina, della cathepsina e delle serina proteasi portano alla rottura della matrice extracellulare della cartilagine e il successivo rilascio di neo-epitopi unici.^{24,25} Utilizzando una combinazione tra modello infiammatorio della cartilagine equina in vitro (stimolato con interleuchina-1 β) e l'analisi MS in seguito all'etichettatura con tag di massa tandem isobarico, Skiöldebrand e collaboratori hanno identificato tre oligo-cartilaginei neo-epitopi della matrice (*cartilage oligomeric matrix protein*-COMP) presenti in concentrazioni elevate nel gruppo stimolato rispetto al gruppo controllo. Uno di questi peptidi è stato quindi selezionato per ulteriori indagini, che hanno portato alla produzione di un anticorpo policlonale specifico e al successivo sviluppo di un test ELISA. Questo test di nuova concezione è stato poi applicato a campioni di liquido sinoviale prelevati da cavalli classificati come sani, con osteoartrite precoce/zoppia acuta, osteoartrite cronica/zoppia cronica e osteoartrite in stadio avanzato. Livelli più elevati di COMP sono stati osservati nel gruppo con osteoartrite precoce/zoppia

acuta, candidando tale test come marcatore precoce dell'osteoartrosi del cavallo.

Malattia squamosa gastrica equina- Equine gastric squamous disease (EGSD)

Tesena e collaboratori nel 2019²⁶ hanno applicato un approccio proteomico per studiare i marcatori delle proteine sieriche per diagnosticare la ESGD, malattia che comporta l'ulcerazione dello stomaco non ghiandolare.²⁶ Come è noto, il metodo più affidabile per diagnosticare l'ESGD è attualmente la gastroscopia, sebbene questo sia spesso indaginoso a causa del tempo necessario per eseguire la procedura, dei costi significativi e della mancanza di disponibilità di specialisti del settore.²⁸ In questo studio, la presenza di segni di colica e la successiva gastroscopia ha permesso di classificare i soggetti sospetti di 'ESGD in: sani (57%), con lieve/moderata ESGD (33%) e grave ESGD (10%). I campioni di siero di ciascun gruppo sono stati raggruppati, le proteine separate tramite elettroforesi su gel 1D e identificate utilizzando la cromatografia liquida-MS/MS. Dieci proteine sono state identificate come potenziali marcatori ESGD. Le proteine β 1,4 N-acetilgalattosaminil transferasi 2 e Xantina deidrogenasi/ossidasi isoforma X6, con ruoli noti rispettivamente nel mantenimento della normale flora intestinale e dello stress ossidativo, sono state identificate come marcatori del normale rivestimento gastrico.^{29,30} Cheratina di tipo I citoscheletrica 10 e l'isoforma X2 della callicreina-13, noti nella protezione della mucosa gastrica, sono stati identificati rispettivamente nel gruppo lieve/moderato e grave.^{31,32} Inoltre, altre sei proteine erano altamente espresse sia nei gruppi ESGD lieve/moderato che grave. Questa ricerca ha quindi identificato un gruppo di marcatori di proteine sieriche che possono aiutare la diagnosi ESGD utilizzando un metodo non invasivo. Tuttavia, come affermato dagli stessi autori, sono necessari la validazione anticorpale e ulteriori studi su una coorte più ampia di cavalli prima che questi marcatori possano essere applicati in ambito clinico.

Colite equina

La colite equina è una malattia diarroica causata dall'infiammazione dell'intestino crasso e può potenzialmente essere pericolosa per la vita a causa della sua rapida progressione.³³ In un

recente studio sono stati analizzati alcuni marcatori proteici a carattere diagnostico o prognostico attraverso l'impiego di una analisi proteomica completa e comparativa utilizzando la tecnica cromatografia-spettrometria di massa tandem (LC-MS/SM).³³ Dopo il primo giorno di trattamento, otto proteine del gruppo con colite sono apparse sovra-esprese rispetto al gruppo sano, tra cui la biliverdina riduttasi B, sovra-espressa nel gruppo dei non sopravvissuti rispetto al gruppo dei sopravvissuti. Nell'ultimo giorno di trattamento, oltre la biliverdina riduttasi B sono apparse sovra-esprese la subunità alfa dell'emoglobina, la clusterina, la gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi e la proteina legante i lipopolisaccaridi nel gruppo dei non sopravvissuti. Sebbene da un lato gli autori concludano che il principale limite della metodica sia il grande numero di substrati proteici individuati, dall'alto gli stessi sottolineano come la visione complessiva di diverse molecole abbia permesso la definizione di un *pattern* d'espressione proteica in grado di consentire una potenziale prognosi o una diagnosi precoce dei cavalli affetti da colite.³³

Patologie respiratorie legate al trasporto.

La tecnica della proteomica è stata impiegata anche in soggetti con patologie respiratorie partendo dall'assunto che il monitoraggio delle concentrazioni di proteine sieriche può fornire informazioni utili per fare diagnosi e aiutare a definire le condizioni degli animali colpiti. Nel campo della medicina veterinaria equina, proteine del siero come proteina C-reattiva, fibrinogeno, aptoglobina ed il siero amiloide A sono un indicatore comune di malattie infiammatorie ma sono carenti nella capacità di caratterizzare la natura del processo patologico sottostante.³⁴

Negli ultimi dieci anni, la spettrometria di massa è diventata una importante metodica per l'identificazione delle proteine e possibili biomarcatori. In un interessante studio condotto da Minamijima e collaboratori nel 2021 sono stati confrontati i proteomi provenienti da sieri di animali sani e affetti da malattie respiratorie associate al trasporto. Le indagini hanno messo in evidenza come quattro proteine, l'apolipoproteina F, la proteina legante i lipopolisaccaridi, il lisozima e la proteina S100-A8 erano sovra regolati, mentre la cheratina 1 era sotto regolata nel gruppo malato. Al termine dello studio gli autori asseriscono che l'infiammazione e la risposta

immunitaria siano coinvolte nei cambiamenti di queste proteine così come affermano come queste proteine siano potenzialmente utili per chiarire il meccanismo di sviluppo delle patologie respiratorie legate al trasporto.³⁴

5.2 Bibliografia

1. Schlieben P, Meyer A, Weise C, et al. Differences in the proteome of high-grade versus low-grade canine cutaneous mast cell tumours. *Vet J*. 2012;194:210–214.
2. Thanomsridetchai N, Singhto N, Tepsumethanon V, et al. Comprehensive proteome analysis of hippocampus, brainstem, and spinal cord from paralytic and furious dogs naturally infected with rabies. *J Proteome Res*. 2011;10:4911–4924.
3. Burgess K, Burchmore R. Strategies to dissect parasite proteomes. *Parasitology*. 2012;139(9):1119–1130.
4. Corthals GL, Wasinger VC, Hochstrasser DF, et al. The dynamic range of protein expression: a challenge for proteomic research. *Electrophoresis*. 2000;21:1104–1115.
5. Rogowska-Wrzesinska A, Le Bihan MC, Thaysen-Andersen M, et al. 2D gels still have a niche in proteomics [published online January 24, 2013]. *J Proteomics*.
6. Bridges DJ, Pitt AR, Hanrahan O, et al. Characterisation of the plasma membrane subproteome of bloodstream form *Trypanosoma brucei*. *Proteomics*. 2008 8(1):83–99.
7. Hartinger J, Stenius K, Högemann D, et al. 16-BAC/SDS-PAGE: a two-dimensional gel electrophoresis system suitable for the separation of integral membrane proteins. *Anal Biochem*. 1996;240(1):126–133.
8. Yates JR, Ruse CI, Nakorchevsky A. Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. *Annu Rev Biomed Eng*. 2009;11:49–79.
9. Xie F, Liu T, Qian WJ, et al. Liquid chromatography-mass spectrometry-based quantitative proteomics. *J Biol Chem*. 2011;286:25443–25449.
10. Alban A, David SO, Björkstén L, et al. A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard. *Proteomics*. 2003;3:36–44.
11. Daneshvar H, Wyllie S, Phillips S, et al. Comparative proteomics profiling of a gentamicin-attenuated *Leishmania infantum* cell line identifies key changes in parasite thiol-redox metabolism. *J Proteomics*. 2012;75(5):1463–1471.
12. Ross PL, Huang YN, Marchese JN, et al. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol Cell Proteomics*. 2004;3:1154–1169.
13. Hsu JL, Huang SY, Chen SH. Dimethyl multiplexed labeling combined with microcolumn separation and MS analysis for time course study in proteomics. *Electrophoresis*. 2006;27:3652–3660.
14. Ong SE, Blagoev B, Kratchmarova I, et al. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2002;1:376–386.
15. Burchmore R. Identification of anti-infective targets through comparative proteomics. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2006;4(2):163–165.
16. Clutterbuck AL, Smith JR, Allaway D, et al. High throughput proteomic analysis of the secretome in an explant model of articular cartilage inflammation. *J Proteomics*. 2011;74(5):704–715.
17. Hauck SM, Hofmaier F, Dietter J, et al. Label-free LC-MS/MS analysis of vitreous from autoimmune uveitis reveals a significant decrease in secreted Wnt signaling inhibitors DKK3 and SFRP2. *J Proteomics*. 2012;75(14):4545–4554.
18. Skiöldebrand E, Ekman S, Mattsson Hultén L, Svala E, Björkman K, Lindahl A, et al. Cartilage oligomeric matrix protein neoepitope in the synovial fluid of horses with acute lameness: a new biomarker for the early stages of osteoarthritis. *Equine Vet J*. 2017;49:662–7.
19. Skiöldebrand E, Ekman S, Mattsson Hultén L, Svala E, Björkman K, Lindahl A, et al. Cartilage oligomeric matrix protein neoepitope in the synovial fluid of horses with acute lameness: a new biomarker for the early stages of osteoarthritis. *Equine Vet J*. 2017;49:662–7.

20. Brommer H, van Weeren PR, Brama PA. New approach for quantitative assessment of articular cartilage degeneration in horses with osteoarthritis. *Am J Vet Res.* 2003;64:83–7.
21. Hunter DJ, Nevitt M, Losina E, Kraus V. Biomarkers for osteoarthritis: current position and steps towards further validation. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2014;28:61–71.
22. McIlwraith CW, Kawcak CE, Frisbie DD, Little CB, Clegg PD, Peffers MJ, et al. Biomarkers for equine joint injury and osteoarthritis. *J Orthop Res.* 2018;36:823–31.
23. Ben-Aderet L, Merquiol E, Fahham D, Kumar A, Reich E, Ben-Nun Y, et al. Detecting cathepsin activity in human osteoarthritis via activity-based probes. *Arthritis Res Ther.* 2015;17:69.
24. Polur I, Lee PL, Servais JM, Xu L, Li Y. Role of HTRA1, a serine protease, in the progression of articular cartilage degeneration. *Histol Histopathol.* 2010;25:599–608.
25. Peffers MJ, Thornton DJ, Clegg PD. Characterization of neo-peptides in equine articular cartilage degradation. *J Orthop Res.* 2016;34:106–20.
26. Tesena P, Yingchutrakul Y, Roytrakul S, Taylor J, Angkanaporn K, Wongtawan T. Searching for serum protein markers of equine squamous gastric disease using gel electrophoresis and mass spectrometry. *Equine Vet J.* 2019;51:581–6.
27. Hewetson M, Sykes BW, Hallowell GD, Tulamo R-M. Diagnostic accuracy of blood sucrose as a screening test for equine gastric ulcer syndrome (EGUS) in adult horses. *Acta Vet Scand.* 2017;59:1–9.
28. Groux-Degroote S, Wavelet C, Krzewinski-Recchi M-A, Portier L, Mortuaire M, Mihalache A, et al. The International Journal of bio-chemistry b4galnt2 gene expression controls the biosynthesis of Sda and Sialyl Lewis X antigens in healthy and cancer human gastro-intestinal tract. *Int J Biochem Cell Biol.* 2014;53:442–9.
29. Prichard M, Ducharme NG, Wilkins PA, Erb HN, Butt M. Xanthine oxidase formation during experimental ischemia of the equine small intestine. *Can J Vet Res.* 1991;55:310.
30. Santos M, Bravo A, Lo C, Paramio M, Jorcano L. Severe Abnormalities in the oral mucosa induced by suprabasal expression of epidermal keratin K10 in transgenic mice*. *J Biol Chem.* 2002;277:35371–7.
31. Konstantoudakis G, Florou D, Mavridis K, Papadopoulos IN, Scorilas A. Kallikrein-related peptidase
32. (KLK13) gene expression status contributes significantly in the prognosis of primary gastric carcinomas. *Clin Biochem.* 2010;43:1205–11
33. Minamijima Y, Tozaki T, Kuroda T, Urayama S, Nomura M, Yamamoto K. A comprehensive and comparative proteomic analysis of horse serum proteins in colitis. *Equine Vet J.* 2022 Nov;54(6):1039-1046. doi: 10.1111/evj.13554. Epub 2022 Jan 18. PMID: 35000251.
34. Minamijima Y, Niwa H, Uchida E, Yamamoto K. Comparison of the proteomes in sera between healthy Thoroughbreds and Thoroughbreds with respiratory disease associated with transport using mass spectrometry-based proteomics. *J Equine Sci.* 2021 Mar;32(1):11-15,

PARTE SPERIMENTALE

MATERIALE E METODI

Animali

Durante il seguente studio sono stati arruolati n°31 cavalli adulti, di età compresa tra 7-18 anni, di genere maschile (12/31) e femminile (19/31), appartenenti a razze diverse, in un periodo compreso tra aprile 2022 e giugno 2023. Gli animali sono stati selezionati dopo essere stati riferiti al Servizio Mobile di Didattica Clinica dell'Ospedale Veterinario Universitario Didattico (OVUD) del Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali – Università degli Studi di Napoli Federico II.

Ventuno animali presentavano segni clinici di colica da costipazione non complicata, mentre 10 cavalli, sottoposti a visita di controllo per vaccinazione, sono stati considerati sani e arruolati come gruppo controllo. Gli animali malati sono stati sottoposti a terapia medica conservativa. Tutte le procedure eseguite sugli animali hanno rispettato le *good clinical practice*¹ e sono state compiute sempre dalla medesima esperta *équipe* Medico Veterinaria; inoltre, i proprietari sono stati informati sulle finalità e metodologia dello studio esprimendo un consenso informato debitamente firmato. Tutte le procedure adottate rientravano nel protocollo clinico-diagnostico di *routine* dell'OVUD che prevedeva, tra l'altro, la raccolta di campioni ematologici per l'esecuzione di indagini emato-biochimiche di base; per questa ragione, non sono stati eseguiti ulteriori prelievi di sangue con finalità scientifiche e non è stato necessario richiedere alcuna approvazione da parte Organismo Preposto al Benessere Animale dell'Ateneo federiciano.

Durante l'intero studio sono state seguite linee guida STROBE (<http://www.strobe-statement.org>) per gli studi osservazionali al fine di garantire il corretto rigore metodologico.

Gruppo Malati

Eleggibilità e procedure cliniche

Al fine di costituire un gruppo di animali malati il più omogeneo possibile, sono stati adottati i seguenti criteri di eleggibilità: (i) essere affetti esclusivamente da colica da costipazione della flessura pelvica o del colon dorsale o di quello ventrale identificata dal proprietario non più di 3 ore prima del ricovero, (ii) non presentare segni di reflusso gastrico; (iii) non presentare complicazioni nonché ripercussioni d'organo o sistemiche conseguenti allo stato di malessere diagnosticato; (iv) essere stati trattati in maniera conservativa con lo stesso protocollo, (v) aver mostrato pieno successo terapeutico con risoluzione della patologia entro 5 giorni; (vi) non essere stati affetti da patologie pregresse (la medesima o di altra natura) nei dodici mesi precedenti.

Per tutti gli animali malati è stata raccolta una anamnesi accurata ed effettuato un esame obiettivo generale e particolare dell'apparato digerente secondo quanto descritto da Sgorbini e collaboratori (2023)² e da Ciaramella (2023).³ In particolare, è stato eseguito una ispezione del cavo orale, l'esame completo dell'addome (ispezione, palpazione, percussione ed auscultazione) e, infine, l'esplorazione rettale.

Tutti gli animali arruolati sono stati sottoposti ad ecografia trans-addominale completa secondo le indicazioni di Jeune e collaboratori (2014).⁴ Brevemente, l'addome è stato suddiviso idealmente in 3 regioni: 1) regione para-lombare: dalla tuberosità del coxale al ginocchio; 2) regione degli spazi intercostali: dal 5° al 17° spazio intercostali, dai margini ventrali polmonari alle giunzioni costocondrali; 3) regione ventrale: dallo sterno alla regione inguinale. Ogni regione è stata accuratamente esaminata in senso cranio-caudale e dorso-ventrale. A tale scopo è stato utilizzato un ecografo dotato di sonda *convex* con frequenza compresa tra 2–5 MHz (ESAOTE s.p.a., MyLab™ Alpha, Genova, IT).

Successivamente, tutti i soggetti sono stati sottoposti a sondaggio naso-gastrico per escludere la presenza di reflusso. La procedura è stata effettuata secondo le indicazioni di Londoño (2017)⁵ che prevedeva, essenzialmente, l'uso di sonda in plastica trasparente, senza mandrino, introdotta per via nasale previa lubrificazione.

Analisi emato-biochimiche

Come da protocollo clinico-terapeutico dell'OVUD, in tutti i soggetti in cui si sospettava una colica in atto è stato effettuato un prelievo venoso di 10 mL dalla giugulare previa tricotomia e disinfezione dell'area. I campioni di sangue sono stati sottoposti ad esame emocromocitometrico mediante conta globuli (IDEXX ProCyt Dx, Westbrook, USA) e ad indagini emato-biochimiche utilizzando un apparecchio *multianalyzer* (SAT450, AMS, Roma, IT) che includevano la valutazione dell'urea, creatinina, glucosio, proteine totali, alanina aminotransferasi (ALT), aspartato aminotransferasi (AST), colesterolo totale, *high-density lipoprotein*, *low-density lipoprotein*, triglicerici, albumina, proteina C reattiva, siero amiloide A, aptoglobuline. Un'aliquota di 2 mL di siero è stata stoccata in provette *ependorf* (Eppendorf Tubes® 3810X – Microprovetta Milano IT) e immediatamente congelata a -80°C per successive determinazioni proteomiche. Inoltre, sempre in accordo con il protocollo clinico-diagnostico previsto dall'OVUD per i cavalli ricoverati, è stato eseguito un ulteriore prelievo ematologico alle dimissioni, processato con le medesime metodologie e finalità.

Terapia conservativa

Tutti i cavalli malati hanno ricevuto il trattamento conservativo convenzionale secondo quanto suggerito da Plummer e collaboratori (2009)⁶: (i) una sedazione con Xilazina Cloridrato a 0.1 mg/kg per via endovenosa (IV) all'arrivo in presenza di sintomatologia acuta (Nerfasin® 20 mg/ml soluz. iniett. 1 flacone 25 ml®, P.H. Farmaceutici S.p.A.); (ii) un trattamento analgesico mediante antinfiammatorio non steroideo a base di flunixin sale di meglumina ad un dosaggio di 0.5 mg/kg IV, 4 volte al giorno (Flunixin® Soluzione Iniettabile 5%, Vétoquinol Italia S.r.l.); (iii) un trattamento lassativo mediante Olio minerale ad un dosaggio di 5-10 ml/kg somministrato mediante sondaggio naso-gastrico (Olio Vivo Cavalli-3L, F.A.ZOO. Green Energy S.r.l., Pesaro, IT); (iv) solfato di magnesio somministrato ad un dosaggio di 1 g/kg in due litri d' acqua mediante sondaggio naso-gastrico, una volta al giorno, per 3 giorni (Equipower – Megnesium, Vetripharm GmbH, Hurlach, DE); (iv) fluido-terapia parenterale con soluzione elettrolitica bilanciata (a compensazione degli squilibri elettrolitici eventualmente identificati) ad un dosaggio di 120-240 ml/kg/giorno; (v) sospensione dell'alimento.

I cavalli sono stati, quindi, costantemente monitorati per tutta la durata del ricovero ed ogni 12h sono stati nuovamente eseguiti: esame clinico completo ecografia addominale, ed esplorazione rettale con le modalità riportate in precedenza. Un animale veniva considerato guarito e successivamente dimesso alla remissione completa dei segni clinici osservati al momento della diagnosi ovvero al rientro nei range specifici per specie di FC, FR, T°C, stato di idratazione e auscultazione addominale; dovevano aver inoltre ripreso le normali funzioni organiche di alimentazione e defecazione e, all'esplorazione rettale, non doveva essere più rilevata alcuna anomalia riconducibile al motivo del ricovero. Da quando gli animali erano considerati clinicamente sani, gli stessi erano sottoposti ad un periodo di osservazione di 48h prima delle dimissioni.

Gruppo Sani

Eleggibilità e Procedure cliniche

Per definire il GS sono stati adottati i seguenti criteri di eleggibilità: (i) essere clinicamente sani al momento della visita; (ii) avere tutti i parametri valutati attraverso le indagini emato-biochimiche all'interno degli intervalli di riferimento per la specie; (iii) non essere stati affetti da patologie negli ultimi 12 mesi di vita. Per tutti gli animali appartenenti al GS è stata quindi raccolta una anamnesi accurata ed effettuato un esame clinico completo con particolare riferimento all'apparato cardiocircolatorio, respiratorio e digerente secondo quanto indicato da Ferro (2023)² e Ciaramella (2023).³

A differenza del GM, in questi animali è stata effettuata una sola raccolta ematologica mediante prelievo di sangue da vena giugulare previa tricotomia e disinfezione dell'area come previsto dal protocollo dell'OVUD per il monitoraggio annuale dello stato di salute. Complessivamente sono stati raccolti 10 mL di sangue venoso processati con le medesime metodologie e finalità illustrate in precedenza.

Preparazione del campione e analisi LC-MS/MS

Le analisi di proteomica sono state eseguite presso il CEINGE-Biotecnologie avanzate Franco Salvatore - Università degli Studi di Napoli Federico II. Il siero di tutti gli animali arruolati è stato impoverito delle proteine più abbondanti utilizzando cartucce Proteominer® Protein Enrichment Kits (Biorad, Hercules, California, US) secondo il protocollo indicato dalla casa produttrice.⁷ I lisati proteici impoveriti sono stati digeriti con tripsina utilizzando supporti S-trap™ (ProtiFi, Fairport, USA), seguendo nuovamente le indicazioni della casa produttrice.⁸ I peptidi ottenuti sono stati sottoposti ad analisi LC-MS/MS mediante spettrometria di massa (ThermoFisher Scientific™ Orbitrap - Orbitrap Exploris 240, Waltham, USA) dotato di un sistema di pompa del controllo del nano-flusso (Thermo Scientific™ - Vanquish™ HPLC & UHPLC Systems, ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) e sorgente ionica (Nanospray Flex™ Waltham, USA). I campioni sono stati quindi frazionati su una colonna capillare C18 a fase inversa (ThermoFisher Scientific, 150 mm, 75 µm, 2 µm 100Å, Bellefonte, USA) ad un flusso operativo di 250 nl/min; è stato utilizzato un gradiente lineare di eluente B (0,2% acido formico in 95% acetonitrile) e A (0,2% acido formico e 2% acetonitrile in acqua di grado LC-MS) dal 2% al 90% in 45 minuti. Il metodo MS/MS ha utilizzato una modalità di acquisizione dati-dipendente (DDA) consistente in una scansione completa nell'intervallo da 375 a 1200 m/z seguita dalla frammentazione di 20 ioni (scansione MS/MS) selezionati in base all'intensità e allo stato di carica (+ 2, +3 e cariche multiple) con tempo di esclusione dinamica di 40 s. Tutti i campioni sono stati analizzati in triplicato tecnico. I dati grezzi ottenuti sono stati analizzati utilizzando la piattaforma MaxQuant®⁹ integrata con il motore di ricerca Andromeda® per effettuare ricerche nei database *Horse_2023_10_24* Uniprot e Swissprot (*Equus caballus*) per l'identificazione delle proteine. I parametri selezionati per l'identificazione delle proteine sono stati impostati come segue: minimo 2 peptidi, almeno 1 unico; precisione per la prima ricerca 10 parti per milione (ppm) e inferiore 5 ppm nella ricerca principale; è stato applicato un *False Discovery Rate* [FDR, proporzione di falsi positivi (errori di Tipo I) tra le ipotesi rigettate dal test ed i possibili falsi positivi] pari a 0.01. Le popolazioni proteiche

esprese sono state valutate mediante software dedicato (Perseus^{®10}).

Statistica

I dati sono stati espressi come numeri assoluti, percentuali e media $\pm$ SD (deviazione standard), mediana e *interquartile range* 1 e 3 (IQR1-3). Le variabili sono state analizzate mediante statistica descrittiva *standard*. La normalità è stata ottenuta effettuando una trasformazione in Log_2 dei valori delle LFQ *intensity* di ciascuna proteina nel rispettivo campione.

Per analizzare i dati ottenuti è stato effettuato un confronto tra: (i) animali affetti dalla patologia prima (al ricovero) e dopo il trattamento conservativo (alle dimissioni); (ii) pazienti affetti da sintomatologia acuta (GM al ricovero) rispetto al gruppo controllo (GS). Per ciò che concerne i parametri emato-biochimici, sia per la valutazione delle differenze intra-gruppo (GM al ricovero vs. GM alle dimissioni) sia per quelle intergruppo (GM al ricovero vs. GS e GM alle dimissioni vs. GS) è stato eseguito un *Mann Whitney U test*. Probabilità ≤ 0.05 sono state considerate significative.

Durante l'analisi dei dati proteomici, per la valutazione delle differenze intra-gruppo (GM al ricovero vs. GM alle dimissioni) è stato eseguito un *test-t* di *Student* a campioni appaiati poiché si trattava di misure ripetute dello stesso campione ed ipotesi nulla pari a 0. Per la valutazione delle differenze intergruppo (GM al ricovero vs. GS) è stato eseguito un *test-t* di *Student* a campioni indipendenti poiché caratterizzati da assenza di correlazione tra le osservazioni tra i due campioni ed ipotesi nulla pari a 0. Per entrambi i confronti è stata fissata una soglia di *False Discovery Rate* con un $\alpha \leq 0.05$. Le variazioni di espressione delle proteine sono state calcolate come rapporti di abbondanze (*Fold Changes*) espresse in termini di LFQ *intensity*, o metodo dello ione estratto, mediante quantificazione *Label-free* sia nella comparazione intra-gruppo sia in quello intergruppo. La soglia *Fold Change* per differente espressione biologicamente significativa è stata impostata a $\text{Log}_2 > 0.5$ e $\text{Log}_2 < -0.5$. I dati sono stati rappresentati mediante tabelle riportanti il Log_2FC (valore medio post-trattamento/valore medio pre-trattamento e valore medio pre-trattamento/valore medio gruppo sani), *Volcano Plots*, grafici di analisi delle variabili a componenti principali (ACP) e *network* proteico a *layout* radiale derivante ottenuto dall'analisi funzionale delle molecole (Cytoscape[®], open source software, 3.10.1)

RISULTATI

Secondo i criteri di eleggibilità adottati nel presente studio sono stati arruolati, in modo retrospettivo, 10 cavalli, di età compresa tra 7 e i 12 anni, di genere maschile (5/10) e femminile (5/10), appartenenti a razze diverse; di questi, 7 costituivano il gruppo dei soggetti malati (GM) e 3 sono stati arruolati come sani (GS). Gli animali malati presentavano un'anamnesi simile che comprendeva almeno una delle seguenti carenze: problemi di dentizione (mancato pareggio), diete non bilanciate correttamente, scarso movimento, assenza di acqua *ad libitum*. Dei n°7 cavalli malati, n°3 risultavano affetti da costipazione del colon ventrale, n°3 da costipazione della flessura pelvica e n°1 del colon dorsale (Tabella 6).

Al momento del ricovero (fase acuta), tutti i cavalli presentavano segni di dolore moderato, frequenza cardiaca media di 68.1 ± 5.2 (battiti per minuto $\pm$ SD), frequenza respiratoria media di 30.1 ± 6.1 (atti respiratori minuto $\pm$ SD), normotermia (37.5 - 38.5°C), stato del sensorio vigile in n°3 casi, agitato in n°1 caso e depresso in n°3, mucose rosee, tempo di riempimento capillare $<3''$, grado di disidratazione medio del 2%, sospensione della defecazione e anoressia. L'esame particolare dell'apparato gastroenterico ha rilevato in n°4 casi sospensione completa dei rumori gastrointestinali auscultabili nei quattro quadranti addominali (dorsale destro e sinistro, ventrale destro e sinistro); in n°2 soggetti i rumori gastrointestinali auscultabili nei quattro quadranti addominali erano diminuiti ed in 1 caso erano diminuiti solo quelli dei quadranti addominali ventrali. L'esplorazione rettale ha evidenziato in n°3 cavalli pareti edematose del tratto interessato, segni di algia alla palpazione e presenza di una formazione dura, a superficie liscia, non mobile delle dimensioni di un avambraccio ripiegata ad "U" con apertura craniale situata davanti all'ingresso del bacino compatibile con costipazione della flessura pelvica. Le altre strutture palpabili con l'esplorazione rettale non hanno mostrato nessun cambiamento apprezzabile.

In altri n°3 cavalli sono state riscontrate pareti edematose del tratto interessato, lievi segni di algia alla palpazione e una formazione dura della grandezza di un avambraccio che partiva dalla zona ventrale-sinistro della cavità addominale a quella dorsale mediale della cavità pelvica e che presentava sulla superficie tenie longitudinali e tasche compatibili con la costipazione del colon

ventrale di sinistra. Anche in questo caso le altre strutture palpabili con l'esplorazione rettale non hanno mostrato nessun cambiamento apprezzabile. In n°1 cavallo è stata infine riscontrata una formazione dura, cedevole alla digitopressione, delle dimensioni di circa 10 cm di diametro, situata dorsalmente a destra all'altezza della 17-18° vertebra toracica, compatibile con la costipazione del colon dorsale di destra. Anche in questo caso le altre strutture palpabili con l'esplorazione rettale non hanno mostrato nessun cambiamento apprezzabile (Tabella 6).

L'esame ecografico completo dell'addome è risultato negativo per tutti i pazienti, ed ha permesso di escludere la presenza di altre patologie o compromissione di altri organi in seguito alla costipazione.

Gli esami emato-biochimici hanno mostrato valori medi al disopra dei *range* di normalità nel GM, al ricovero e alle dimissioni, solo per i parametri trigliceridi (al ricovero, media=142.7 mg/dL e alle dimissioni, media=72.6 mg/dL) e siero amiloide A (al ricovero, media=64.1 µg/mL e alle dimissioni, media=36.5 µg/mL). Una differenza significativa è stata quindi trovata nella comparazione GM al ricovero vs. GS sia per i trigliceridi (mediana GM=157.0 mg/dL, IQR1-3=33-224 mg/dL vs. mediana GS=27.0 mg/dL, IQR1-3=26-/mg/dL, P<0.05) sia per il siero amiloide A (mediana GM=36.0 µg/mL, IQR1-3=0.3-134.8 µg/mL vs. mediana GS=0.2 µg/mL, IQR1-3=0.2-/µg/mL, P<0.05). Nessuna differenza è stata invece osservata nella comparazione GM al ricovero vs. GM alle dimissioni nonché in quella GM alle dimissioni vs. GS per ambo le variabili

Tutti gli altri parametri considerati erano nei limiti della norma per la specie.

Tabella 6: *Riepilogo delle caratteristiche cliniche (segnalamento e principali segni clinici) osservati in cavalli affetti da colica da costipazione (n=7) al momento del ricovero.*

Razza	Tipo di costipazione	FC (bpm)	FR (arm)	Motivo del ricovero	AA		Sensorio (al ricovero)	Def
					DD VD	DS VS		
TI	FP	72	36	AN + CA	(-) (-)	(-) (-)	Depresso	S
TI	FP	65	22	AN + GF	(+/-) (+/-)	(+/-) (+/-)	Vigile	S
TI	FP	65	30	AN + I	(-) (-)	(-) (-)	Agitato	S
					(-)	(-)		

SI	CD	73	38	AN + CA	(-)	(-)	Depresso	S
TI	CV	62	26	AN + GF	(++) (+/-)	(++) (+/-)	Vigile	S
SI	CV	64	24	AN + I	(+/-) (+/-)	(+/-) v	Vigile	S
SI	CV	76	35	AN + GF	(-) (-)	(-) (-)	Depresso	S

n=numero; TI=trottatore italiano; M=murgese; SI=sella italiano; FP=flessura pelvica; CD=colon dorsale; CV=colon ventrale; FC=frequenza cardiaca; FR=frequenza respiratoria; bpm=battiti per minuto; arm=atti respiratori minuto; AN=anoressia; CA=calciare addome; GF=guardarsi il fianco; I=irrequietezzaAA=auscultazione addome; DD=quadrante addominale dorsale destra; DS=quadrante addominale dorsale sinistra; VD=quadrante addominale ventrale destra; VS=quadrante addominale ventrale sinistra; (++)=Rumori intestinali chiaramente distinguibili; (+/-)=Rumori intestinale non chiaramente distinguibili; (-)=Rumori intestinali sospesi; Def=defecazione; S=sospesa

Proteomica

Dall’analisi campioni di sangue raccolti sono state identificate complessivamente 1093 proteine. In particolare, sono state identificate un totale di 537 nel confronto pretrattamento (fase acuta/ricovero) e gruppo di controllo (animali sani); mentre, un totale di 556 proteine nel confronto post-trattamento (guarigione/dimissioni) vs. pretrattamento (fase acuta/ricovero). Nella comparazione inter-gruppo (pretrattamento vs. gruppo di controllo), un totale di 47 proteine mostravano una differente espressione ($P<0.05$), mostrando a loro volta 25 proteine sovra-esprese e 22 sotto-esprese nei soggetti in cui è stato diagnosticato il problema (fase acuta/ricovero) (Tabella 7 e Grafico 2). Invece, nella comparazione intra-gruppo (post-trattamento vs. pre-trattamento), un totale di 70 proteine erano caratterizzate una differenza significativa di espressione tra i due tempi di osservazione ($P<0.05$), mostrando a loro volta 29 proteine sovra-esprese e 41 sotto-esprese dopo il trattamento (guarigione/dimissioni) (Tabella 6 e Grafico 1).

Tabella 7. Cambiamenti di espressione delle proteine nel siero di cavalli affetti da colica da costipazione (n=7) nel confronto pretrattamento (fase acuta - ricovero) vs. gruppo di controllo (animali sani) (n=3). I parametri sono ordinati dal più sovra-espressi (↑) al più sotto-espresso (↓).

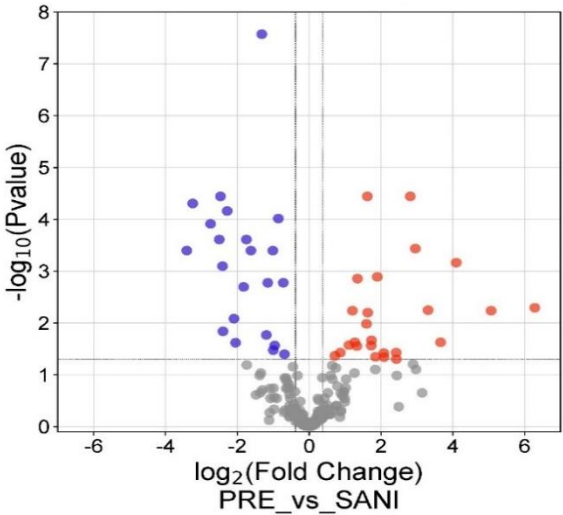
Codice della proteina	Nome della proteina	GENE	LOG ₂ FC	Reg	p-Value	FBP
A0A5F5PJN1	Serum amyloid A protein	SAA	6,28	↑	<0.01	risposta immunitaria
A0A3Q2HJE2	MHC class I antigen 3.7	EQMCE1	5,06	↑	<0.01	risposta immunitaria
F7DP84	Apolipoprotein E	APOA5	4,09	↑	<0.01	metabolismo lipidi
Q6X9X1	Beta-2-microglobulin (Fragment)	B2M	3,66	↑	<0.05	risposta immunitaria
A0A9L0SXI9	H2B clustered histone 5	H2BC5	3,31	↑	<0.01	proteina strutturale
A0A9L0RE71	Uncharacterized protein	H2AC10	2,96	↑	<0.0001	sconosciuto
Q9XSE9	EQUPR Hemoglobin subunit alpha	HBA	2,81	↑	<0.0001	trasporto ossigeno
F6X485	Myosin heavy chain 9	MYH9	2,43	↑	<0.05	proteina strutturale
A0A3Q2HTG2	Fibrinogen alpha chain	FGA	2,42	↑	<0.05	processo coagulativo
A0A9L0THF4	H2A clustered histone 6	H2AC6	2,08	↑	<0.05	proteina strutturale

P02062	Hemoglobin subunit beta	HBB	2,08	↑	<0.05	risposta immunitaria
O77811	Lactotransferrin (Fragment)	LTF	1,90	↑	<0.01	risposta immunitaria
F6R5Y2	Serpin family A member 5	SERPINA5	1,85	↑	<0.05	interazioni proteiche
F6RMK1	C-X-C motif chemokine	LOC100630489	1,73	↑	<0.05	risposta immunitaria
A0A9L0TRA7	Vimentin	VIM	1,73	↑	<0.05	risposta immunitaria
A0A3Q2LBP6	Complement factor D	CFD	1,63	↑	<0.01	metabolismo lipidi
K9KEL6	Proteasome subunit alpha type (Fragment)	2 SV	1,62	↑	<0.0001	interazioni proteiche
F7BFT1	Peroxiredoxin 2	PRDX2	1,60	↑	<0.05	antiossidante
F6SUS2	Serpin family A member 10	SERPINA10	1,34	↑	<0.01	processo coagulativo
F7BTW7	Complement C3	C3	1,33	↑	<0.05	risposta immunitaria
F7DIN1	Fibrinogen like 1	FGL1	1,27	↑	<0.05	interazioni proteiche
A0A9L0RYA4	Proteasome 20S subunit alpha 7	PSMA7	1,20	↑	<0.01	interazioni proteiche
A0A3Q2HMQ1	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4	ITI4	1,11	↑	<0.05	risposta immunitaria
F6VTD3	SMB domain-containing protein	PRG4	0,87	↑	<0.05	interazioni proteiche
A0A5F5PUE2	Kininogen 1	KNG1	0,72	↑	<0.05	processo coagulativo
A0A0A1E9D0	Immunoglobulin lambda light chain variable region (Fragment)	IGL	-0,69	↓	<0.05	risposta immunitaria
F6PVG3	EGF containing fibulin extracellular matrix protein 1	EFEMP1	-0,72	↓	<0.01	matrice extracellulare
A0A3Q2GXX5	Fibulin-1	FBLN1	-0,86	↓	<0.0001	processo coagulativo
A0A9L0RSH1	Heparan sulfate proteoglycan 2	HSPG2	-0,96	↓	<0.05	matrice cellulare
F6SRH3	Fibulin 5	FBLN5	-1,00	↓	<0.05	proteina strutturale
A0A0A1E9B4	Immunoglobulin lambda light chain variable region (Fragment)	IGL	-1,01	↓	<0.0001	risposta immunitaria
F6QYS3	Extracellular matrix protein 1	ECM1	-1,15	↓	<0.01	matrice extracellulare
A0A5F5PEG5	Protein AMBP	AMBP	-1,19	↓	<0.05	antiossidante
A0A9L0SN64	EGF containing fibulin extracellular matrix protein 2	EFEMP2	-1,32	↓	<0.0001	processo coagulativo
A0A3Q2HCG1	HGF activator	HGFAC	-1,62	↓	<0.0001	processo coagulativo
A0A0A1E976	Immunoglobulin lambda light chain	IGL	-1,75	↓	<0.0001	risposta immunitaria

	variable region (Fragment)					
A0A3Q2I8H8	Galectin-3-binding protein	LGALS3BP	-1,83	↓	<0.05	risposta infiammatoria
A0A5F5PLV2	Carboxypeptidase B2	CPB2	-2,05	↓	<0.05	processo coagulativo
F7CN11	Fibronectin	FN1	-2,09	↓	<0.01	processo coagulativo
A0A3Q2IBT8	Tubulin alpha chain	TUBA4A	-2,28	↓	<0.0001	proteina strutturale
F6QQT6	Fibrinogen C-terminal domain-containing protein	LOC100069029	-2,40	↓	<0.05	interazione traccellule
F6ZSB4	Tubulin alpha chain	LOC100059285	-2,41	↓	<0.01	proteina strutturale
F6Q666	Tubulin beta chain	TUBB1	-2,47	↓	<0.0001	proteina strutturale
A0A3Q2H3R5	Tubulin beta chain	TUBB4B	-2,50	↓	<0.0001	proteina strutturale
A0A9R1SR95	Tubulin beta class I	TUBB	-2,75	↓	<0.0001	proteina strutturale
F6TLD9	Tubulin beta chain	TUBB	-3,24	↓	<0.0001	proteina strutturale
F6ZHA6	Microfibril associated protein 4	MFAP4	-3,41	↓	<0.0001	interazione cellulare

Reg=regolazione; FBP=funzione biologica principale; Log₂FC=trasformazione logaritmica dei fold change ottenuti; vs=versus

Grafico 1. Volcano plot che mostra proteine diversamente espresse nel siero di cavalli affetti da colica da costipazione (n=7) nel confronto pretrattamento (fase acuta - ricovero) vs. gruppo di controllo (animali sani) (n=3). Le proteine sovra-regolate (up-regulated) sono rappresentate con i punti rossi, quelle sotto-regolate (down-regulated), sono rappresentate con i punti viola ($p<0,05$).



Log=logaritmo; vs=versus

Tabella 8. Variazione dei livelli di espressione delle proteine nel siero di cavalli affetti da colica da costipazione (n=7) nel confronto post-trattamento conservativo (guarigione – dimissioni) vs. pretrattamento (fase acuta - ricovero) I parametri sono ordinati dal più sovra-espressi (↑) al più sotto-espresso (↓).

Codice della proteina	Nome della proteina	GENE	LOG ₂ FC	Reg	p-Value	FBP
A0A9L0RUS5	<i>Uncharacterized protein</i>	LOC100067869	3,01	↑	<0.0001	sconosciuta
F6X1I8	<i>Hemopexin</i>	HPX	2,88	↑	<0.001	risposta immunitaria
F6VJR6	<i>Alpha-1-B glycoprotein</i>	A1BG	2,68	↑	<0.0001	sconosciuta
A0A9L0SFT5	<i>Uncharacterized protein</i>	LOC100050685	2,49	↑	<0.0001	sconosciuta
P274Z5	<i>Serotransferrin</i>	TF	2,47	↑	<0.001	risposta immunitaria
A0A9L0S4R9	<i>Albumin</i>	ALB	2,26	↑	<0.0001	interazioni proteiche
A0A9L0TS93	<i>Alpha-2-glycoprotein 1, zinc-binding</i>	AZGP1	2,21	↑	<0.001	metabolismo lipidi
F6RI47	<i>Alpha-2-macroglobulin</i>	A2M	2,12	↑	<0.001	processo coagulativo
A0A5F5PUE2	<i>Kininogen 1</i>	KNG1	1,95	↑	<0.0001	processo coagulativo
A0A9L0TSL4	<i>Leucine rich alpha-2-glycoprotein 1</i>	LRG1	1,87	↑	<0.01	interazioni proteiche
B5BV04	<i>Alpha-1-antitrypsin</i>	Spi2-5	1,87	↑	<0.01	interazioni proteiche
F7DLT3	<i>Amine oxidase</i>	G6PC1	1,82	↑	<0.0001	antiossidante
F7CYP1	<i>Alpha-1-antitrypsin</i>	SPI2	1,79	↑	<0.0001	interazioni proteiche
A0A3Q2IDD2	<i>Complement C2</i>	CFB	1,77	↑	<0.0001	risposta immunitaria
A0A3Q2H846	<i>Alpha-1-antitrypsin</i>	SPI2	1,51	↑	<0.001	interazioni proteiche
F7BKE1	<i>Serpin family F member 1</i>	SERPINF1	1,48	↑	<0.001	interazioni proteiche
F6Z041	<i>Beta-2-glycoprotein 1</i>	APOH	1,34	↑	<0.05	processo coagulativo
A0A3Q2ICR1	<i>Complement C2</i>	C2	1,27	↑	<0.05	risposta immunitaria
F6PKE1	<i>Transferrin</i>	INHCA	1,23	↑	<0.01	risposta immunitaria

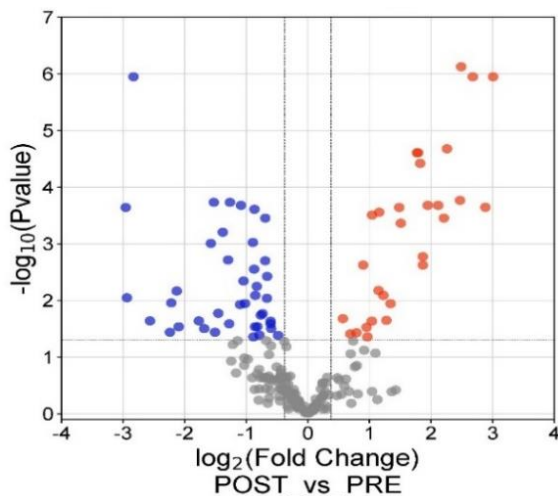
A0A9L0T1B5	<i>Angiotensinogen</i>	AGT	1,16	↑	<0.001	omeostasi circolatoria
A0A5F5PLA4	<i>Immunoglobulin heavy constant mu</i>	IGHM	1,15	↑	<0.01	risposta immunitaria
F6UL68	<i>Transthyretin</i>	TTR	1,04	↑	<0.001	interazioni proteiche
A0A9L0R9S5	<i>Uncharacterized protein</i>	4 SV	1,04	↑	<0.05	sconosciuta
F7AW05	<i>C-type lectin domain family 3 member B</i>	CLEC3B	0,97	↑	<0.05	metabolismo osseo
H9GZQ9	<i>Immunoglobulin heavy constant mu</i>	IGHM	0,95	↑	<0.05	risposta immunitaria
F7B3I5	<i>Afamin</i>	AFM	0,90	↑	<0.01	interazioni proteiche
Q95M34	<i>Immunoglobulin gamma 1 heavy chain constant region (Fragment)</i>	IGHC1	0,79	↑	<0.05	risposta immunitaria
A0A9I5VF08	<i>Histidine-rich glycoprotein</i>	hrg	0,69	↑	<0.05	risposta immunitaria
A0A9L0SRP1	<i>Attractin</i>	ATR1	0,57	↑	<0.05	interazioni proteiche
H9GZN9	<i>Immunoglobulin heavy constant mu</i>	IGHM	-0,48	↓	<0.05	risposta immunitaria
F6QYS3	<i>Extracellular matrix protein 1</i>	ECM1	-0,60	↓	<0.05	matrice extracellulare
A0A5F5PEE6	<i>Apolipoprotein E</i>	APOA4	-0,61	↓	<0.05	metabolismo lipidico
F6WZ69	<i>Procollagen C-endopeptidase enhancer</i>	PCOLCE	-0,61	↓	<0.05	proteina strutturale
W0UVF5	<i>Ribonuclease A B1</i>	RNASE4	-0,66	↓	<0.01	azione enzimatica
F7CU94	<i>Lysozyme</i>	LYZ	-0,67	↓	<0.01	risposta immunitaria
A0A3Q2GXX5	<i>Fibulin-1</i>	FBLN1	-0,69	↓	<0.001	processo coagulativo
F6PVG3	<i>EGF containing fibulin extracellular matrix protein 1</i>	EFEMP1	-0,69	↓	<0.01	processo coagulativo
F6ZFH9	<i>Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein gamma</i>	YWHAG	-0,74	↓	<0.05	metabolismo muscolare

A0A9L0SN64	<i>EGF containing fibulin extracellular matrix protein 2</i>	EFEMP2	-0,76	↓	<0.05	proteina strutturale
F6ZJP9	<i>Lecithin-cholesterol acyltransferase</i>	LCAT	-0,79	↓	<0.05	metabolismo lipidico
F7C7J6	<i>Coagulation factor XIII B chain</i>	F13B	-0,82	↓	<0.05	processo coagulativo
F6VBP9	<i>Apolipoprotein E</i>	APOE	-0,83	↓	<0.01	metabolismo lipidi
O77811	<i>Lactotransferrin (Fragment)</i>	LTF	-0,85	↓	<0.01	risposta immunitaria
Q9GKX7	<i>Heat shock protein HSP 90-α</i>	HSP90AA1	-0,86	↓	<0.05	omeostasi corporea
F7BXD8	<i>CD5 molecule like</i>	CD5L	-0,87	↓	<0.001	risposta immunitaria
A0A9L0RYA4	<i>Proteasome 20S subunit α 7</i>	PSMA7	-0,87	↓	<0.01	interazioni proteiche
F6UZ12	<i>Coagulation factor XIII A chain</i>	F13A1	-0,89	↓	<0.05	processo coagulativo
A0A061DBP6	<i>von Willebrand factor</i>	VWF	-0,89	↓	<0.001	processo coagulativo
A0A9L0TFY3	<i>Heat shock protein 90 β family member 1</i>	HSP90B1	-1,02	↓	<0.05	omeostasi corporea
A0A5F5Q298	<i>Calmodulin 3</i>	CALM3	-1,05	↓	<0.01	metabolismo muscolare
K9KEL6	<i>Proteasome subunit α type (Fragment)</i>	2 SV	-1,09	↓	<0.001	interazioni proteiche
A0A5F5PZZ3	<i>RAP1B, member of RAS onco family</i>	RAP1B	-1,10	↓	<0.05	proteina strutturale
A0A3Q2GYK6	<i>Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta</i>	YWHAZ	-1,27	↓	<0.001	metabolismo muscolare
A0A5F5PP35	<i>Nucleoporin 210 like</i>	NUP210L	-1,28	↓	<0.05	proteina strutturale
F7BFT1	<i>Peroxisedoxin 2</i>	PRDX2	-1,30	↓	<0.01	antiossidante
A0A3Q2KTQ9	<i>Actin β</i>	ACTB	-1,38	↓	<0.001	proteina strutturale
A0A3Q2HIE9	<i>Myosin light chain 6</i>	MYL6	-1,45	↓	<0.05	proteina strutturale

A0A9L0SCR2	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	GAPDH	-1,51	↓	<0.05	antiossidante
F6RMK1	<i>motif chemokine</i>	LOC100630489	-1,53	↓	<0.001	risposta immunitaria
A0A3Q2GX84	<i>Tropomyosin 1</i>	TPM1	-1,58	↓	<0.001	proteina strutturale
F7DP13	<i>Advillin</i>	AVIL	-1,68	↓	<0.05	sconosciuta
F7BH02	<i>Filamin A</i>	FLNA	-1,77	↓	<0.05	proteina strutturale
F6PN89	<i>Talin 1</i>	TLN1	-2,10	↓	<0.05	proteina strutturale
A0A9L0SXI9	<i>H2B clustered histone 5</i>	H2BC5	-2,13	↓	<0.01	proteina strutturale
F6ZTR4	<i>Nucleoporin 210 like</i>	NUP210L	-2,22	↓	<0.05	proteina strutturale
A0A5F5PNM3	<i>Actinin alpha 1</i>	ACTN1	-2,24	↓	<0.05	interazioni proteiche
F6X485	<i>Myosin heavy chain 9</i>	MYH9	-2,56	↓	<0.05	proteina strutturale
A0A9L0RE71	<i>Uncharacterized protein</i>	H2AC10	-2,83	↓	<0.0001	sconosciuta
F7DP84	<i>Apolipoprotein E</i>	APOA5	-2,94	↓	<0.01	metabolismo lipidi
A0A090BWQ4	<i>Actin, alpha skeletal muscle</i>	ACTA1	-2,96	↓	<0.001	metabolismo muscolare

Reg=regolazione; FBP=funzione biologica principale; Log₂FC=trasformazione logaritmica dei *fold change* ottenuti.

Grafico 2. Volcano plot che mostra proteine diversamente espresse nel siero di cavalli affetti da colica da costipazione (n=7) nel confronto post-trattamento conservativo (guarigione – dimissioni) vs. pretrattamento (fase acuta - ricovero). Le proteine sovra-regolate (up-regulated) sono rappresentate con i punti rossi, quelle sotto-regolate (down-regulated), sono rappresentate con i punti viola, le non significative sono riportate con punti grigi ($p < 0.05$).



Log=logaritmo; vs=versus

Inoltre, durante l'analisi dei componenti principali, non è stato evidenziato alcun raggruppamento o *cluster* nella comparazione intra-gruppo (post-trattamento vs. pretrattamento), sebbene complessivamente i dati sembrano mostrare una prevalente natura dicotomica tra le due valutazioni (Grafico 3); mentre, nella comparazione inter-gruppo (pretrattamento vs. gruppo di controllo) è stato identificato raggruppamento o *cluster* a carico del GS (Grafico 4).

Grafico 3. Analisi dei componenti principali dei campioni di siero di cavalli affetti da colica da costipazione (n=7) trattati nell'analisi di proteomica in riferimento al confronto pre-trattamento (fase acuta - ricovero) vs. gruppo di controllo (animali sani) (n=3). In blu sono rappresentati i campioni degli animali del gruppo di controllo, in rosso quelli pre-trattamento.

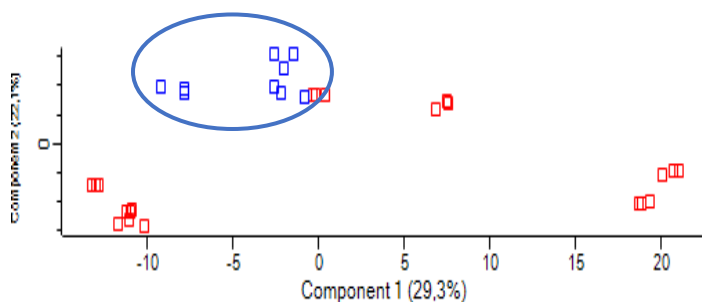
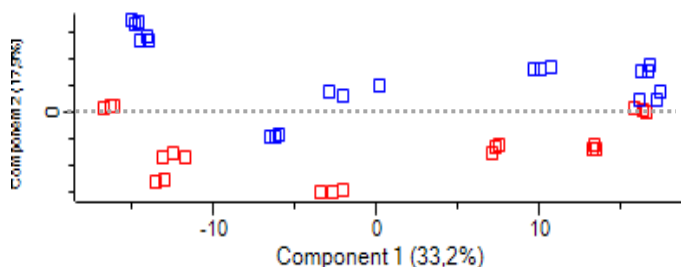


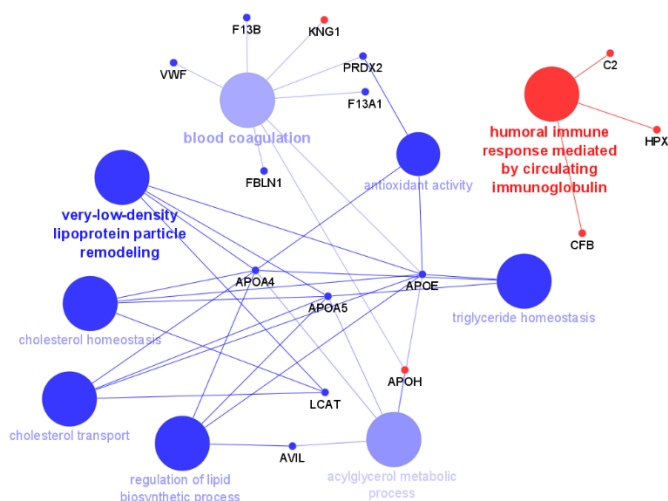
Grafico 4. Analisi dei componenti principali dei campioni di siero di cavalli affetti da colica da costipazione (n=7) trattati nell'analisi di proteomica in riferimento al confronto post-trattamento conservativo (guarigione – dimissioni) vs. pretrattamento (fase acuta - ricovero). In blu sono rappresentati i campioni degli animali post-trattamento, in rosso quelli pre-trattamento.



L'analisi funzionale delle proteine significativamente sotto- e sovra espresse nella comparazione post-trattamento (guarigione/dimissioni) vs. pretrattamento (fase acuta/ricovero) sono illustrate nel Grafico 5. Complessivamente le proteine considerate sono state associate a diverse funzioni biologiche quali: risposta immunitaria umorale mediata dalle immunoglobuline circolanti, coagulazione ematica, attività antiossidante, omeostasi dei trigliceridi, processo metabolico degli acilgliceroli, regolazione del

processo di biosintesi dei lipidi, trasporto ed omeostasi del colesterolo, rimodellamento delle particelle lipoproteiche a densità molto bassa (VLDL). Per quanto concerne l'analisi funzionale delle proteine espresse in maniera significativa nei cavalli pre-trattamento (fase acuta/ricovero) vs. gruppo di controllo (animali sani), non sono stati ottenuti raggruppamenti di arricchimento significativi.

Grafico 5. Rappresentazione grafica del network proteico derivante dall'analisi funzionale delle proteine utilizzando un layout radiale nei cavalli affetti da colica da costipazione (n=7) nel confronto post-trattamento conservativo (guarigione/dimissioni) vs. pretrattamento (fase acuta/ricovero). In blu sono rappresentati i geni delle proteine sotto-esprese (down-regulated), in rosso quelli sovra- espresse (up-regulated).



Di seguito sono riportati i geni che codificano per le proteine corrispondenti sovra- o sotto-esprese: C2=A0A3Q2ICR1 Horse Complement C2 – $\log_2FC$ 1.27; HPX=F6X118 Horse Hemopexin – $\log_2FC$ 2.88; CFB=A0A3Q2IDD2 Horse Complement C2 – $\log_2FC$ 1.77; VWF=A0A061DBP6 horse Von Willebrand factor – $\log_2FC$ -0.89; F13B=F7C7J6 Horse Coagulation Factor XIII B Chain – $\log_2FC$ -0.82; KNG1=A0A5F5PUE2 Horse Kininogen 1 – $\log_2FC$ 1.95; PRDX2=F7BFT1 Horse Peroxiredoxin 2 – $\log_2FC$ -1.30; F13A1=F6UZ12 Horse Coagulation Factor XIII A Chain – $\log_2FC$ -0.89; FBLN1=A0A3Q2GXX5 Horse fibulin 1 – $\log_2FC$ -0.69; APOA4=A0A5F5PEE6 Horse Apolipoprotein E – $\log_2FC$ -0.61; APOA5=F7DP84 Horse Apolipoprotein E – $\log_2FC$ -2.94; APOE=F6VBP9 Horse Apolipoprotein E – $\log_2FC$ -0.83; APOH=F6Z041 Horse Beta 2 Glicoprotein 1 – $\log_2FC$ 1.34; LCAT=F6Z1P9 Horse Lecithin-cholesterol acyltransferase – $\log_2FC$ -0.79; AVIL=F7DP13 Horse Advillin – $\log_2FC$ -1.68.

DISCUSSIONE

Con l'avvento della società moderna, lo sviluppo della tecnologia agraria e la diffusione del benessere, i cavalli, da sempre considerati animali da lavoro, hanno cambiato la loro connotazione all'interno dell'immaginario comune divenendo sempre più animali da compagnia e sempre meno da reddito. Tuttavia, al giorno d'oggi, viene ancora riconosciuto loro un impatto economico importato nei paesi sviluppati dove specifiche razze vengono allevate per l'impiego in attività ludico-sportive, in forme di terapia assistita con animali o per la produzione alimentare.¹⁻² Nonostante la salute e il benessere degli equidi rappresentino un ambito importante della Medicina Veterinaria, alcune malattie ricorrenti, come le coliche da costipazione, rappresentano ancora una significativa sfida clinico-diagnostica. Diviene quindi essenziale trovare nuovi biomarcatori di tali condizioni patologiche che possano migliorare la diagnosi precoce, definirne la severità o valutare l'efficacia di eventuali procedure terapeutiche adottate.³ In considerazione di quanto espresso, l'obiettivo del presente studio è stato quello di utilizzare una tecnica proteomica, basata sulla *Liquid Chromatography with tandem mass spectrometry* (LC-MS/MS), per identificare e caratterizzare delle proteine funzionali espresse in cavalli affetti da colica da costipazione del grosso intestino, al fine di definire l'espressione di potenziali biomarcatori che potessero modificarsi sia nella fase acuta del processo patologico (comparazione inter-gruppo pretrattamento vs. gruppo sani) sia dopo l'impiego di una terapia conservativa convenzionale con successiva guarigione clinica (comparazione intra-gruppo post-trattamento vs. pretrattamento).

Negli ultimi due decenni, la proteomica è stata ampiamente applicata per caratterizzare i contenuti proteici dei fluidi biologici (siero, urine, saliva, ecc.) al fine di identificare potenziali biomarcatori per la diagnosi precoce, la prognosi, il monitoraggio e la gestione delle patologie e delle relative terapie sia in Medicina Umana sia in quella Veterinaria.⁴⁻⁸ Di fatto, questa metodica permette di rendere manifeste interazioni, funzioni e composizione delle strutture proteiche e delle attività cellulari.⁹ Questa metodica fornisce una migliore comprensione della struttura e della funzione dell'organismo rispetto alla genomica, sebbene l'espressione proteica possa essere influenzata dal tempo e dalle condizioni

ambientali d'esecuzione della tecnica.¹⁰ L'attività di ricerca in questo campo può essere divisa essenzialmente in due principali aree di approfondimento: la proteomica differenziale e quella funzionale. La prima, ha come obiettivo la definizione quali- e quantitativa dei livelli di espressione di proteine in seguito alla variazione dello stato biologico dell'organismo (ad esempio, funzionalità cellulare, *stress*, presenza di patologie, ecc.); la seconda, invece, si propone di definire la funzione di proteine aventi un ruolo non ancora noto, studiando le interazioni proteina-proteina per la descrizione dei meccanismi cellulari a livello molecolare.¹¹⁻¹⁴ Il primo tipo di diagnostica “-omica” è stato quello impiegato nel presente studio con l'intento valutare come i processi biologici siano stati influenzati dallo stato patologico e dal trattamento impiegato.

Sebbene esistano diverse tecniche di proteomica, quella scelta per la prova clinica (LC-MS/MS) si caratterizza per la capacità di garantire *performance* ad alta produttività durante il processo di elaborazione. La LC è una tecnica capace di separare le proteine da una miscela complessa e di analizzare biomolecole grandi e fragili; viene utilizzata prevalentemente per la ricerca di nuovi biomarcatori e la comprensione dei meccanismi eziopatogenetici in base alla modifica delle proteine.¹⁵ La MS, invece, può essere utilizzata dopo la separazione delle proteine mediante cromatografia o elettroforesi.¹⁶ Questa è considerata una dei migliori strumenti analitici per facilitare rapidamente il sequenziamento delle proteine nonché la valutazione del peso molecolare;¹⁷ con questa tecnica, le molecole proteiche vengono ionizzate e la loro massa viene calcolata in base ai rapporti massa/carica.¹⁷

Se da un lato la proteomica permette l'accurata valutazione di un ingente numero di proteine espresse, dall'altro va tenuto presente che si tratta di tecnica multifase in cui ogni procedimento deve essere attentamente controllato per evitare che fattori non biologici interferiscano con l'espressione e le interazioni proteiche. In questo senso, la preparazione del campione è fondamentale per ottenere risultati affidabili, accurati e riproducibili poiché prevede passaggi particolarmente critici quali: il corretto stoccaggio del materiale ottenuto (-80°C), la solubilizzazione di tutte le proteine presenti e l'eliminazione dei composti inibitori interferenti (ad esempio, i lipidi).¹⁸

Riguardo i risultati dello studio, per l'identificazione delle proteine è stato utilizzato un *database* equino (*Equus Caballus*_Uniprot e Swissprot) comunemente impiegato anche in altre ricerche.¹⁹ Tuttavia, l'analisi eseguita ha messo in evidenza la presenza di alcune molecole proteiche definite *trEMBL* (*Translated EMBL Nucleotide Sequence Data Library*), ovvero scoperte in questa specie ma aventi funzioni biologiche sconosciute/non verificate. Questo risultato ha reso palese il *deficit* diagnostico che caratterizza la Medicina Ippiatrica rispetto a quella umana dove queste molecole sembrano trovare una giustificazione funzionale; constatata l'assenza di dati specifici e verificabili sul ruolo biologico nei campioni analizzati, sono state quindi utilizzate informazioni provenienti da altre specie animali al fine di una corretta interpretazione del risultato.

Relativamente ai dati ottenuti mediante l'ACP è interessante notare il diverso comportamento proteico nelle due comparazioni eseguite. Infatti, in quella intra-gruppo (post-trattamento vs. pretrattamento) i dati sembrano avere un carattere prevalentemente dicotomico tra le due categorie di animali; mentre in quella inter-gruppo (pretrattamento vs. gruppo controllo) un raggruppamento o *cluster* ha caratterizzato il GS (Grafici 3 e 4). L'ACP è un metodo statistico di analisi multivariata che consente una riduzione delle variabili investigate a partire da quelle originarie, nonché di evitare l'indesiderata duplicazione di quelle dall'andamento simile. Vengono quindi definite delle "nuove variabili" denominate componenti principali, che rappresentano combinazioni lineari di quelle originarie e che consentono il raggruppamento all'interno di sé stesse di tutta una serie di proteine ponderate tramite l'assegnazione di pesi diversificati. Tale analisi si utilizza quando, all'interno di un *dataset*, vi sono molte variabili correlate tra di loro e si mira a ridurne il numero perdendo la minore quantità di informazioni da interpretare. La scelta del numero di componenti principali è effettuata sulla base della varianza cumulativa: non inferiore ad un livello soglia stabilito. Tale scelta permette, da un lato, di estrarre il minor numero di componenti principali, dall'altro, di conservare quanta più significatività possibile evitando di alterare il dato disaggregato di partenza²⁰. L'ACP osservato negli animali post trattamento, ha reso evidenti delle differenze tra le variabili nella comparazione fase acuta vs. guarigione, mostrando, allo stesso tempo, un andamento simile degli analiti scelti nello spazio (Grafico 3). La condizione indicata trova

spiegazione in una netta differenza di espressione dei raggruppamenti proteici simili permettendo di supporre che quest'ultima fosse effettivamente diminuita in questi animali, al momento delle dimissioni. Invece, l'ampia varianza osservata (indicativa di variabili diverse e lontane tra loro) può essere considerata la conseguenza di due possibili fenomeni: (i) una popolazione campione eterogenea che esprima raggruppamenti proteici multipli; (ii) l'attivazione ed espressione di svariate componenti proteiche legate a differenti funzioni biologiche. Nel primo caso è doveroso sottolineare che il raggiungimento di una popolazione campione completamente omogenea è un obiettivo molto arduo da raggiungere in *trial* clinici di campo che, nonostante severi criteri di eleggibilità, lasciano spazio ad un certo grado di variabilità intraspecifica legata alla condizione patologica in atto (simile ma non esattamente uguale) o al pregresso clinico dei singoli individui (impossibile da uniformare). La seconda ipotesi invece contempla la possibilità che, sia nei soggetti in fase acuta sia in quelli clinicamente guariti, vi fosse una diversa espressione di svariati gruppo di proteine simili facenti capo ad altrettanti processi metabolici generati dalla condizione patologica che gli animali hanno vissuto. L'ipotesi sembra trovare conferma nel *network* proteico a *layout* radiale derivante dall'analisi funzionale delle molecole che ha permesso di identificare molteplici attività biologiche/proteine attive (Grafico 5).

Diversa è stata, invece, l'interpretazione dell'esito dell'ACP tra animali in fase acuta ed il gruppo di controllo. In quest'ultimo gruppo è stato possibile identificare un *cluster*, ossia un gruppo di rappresentanti proteici che racchiuda al suo interno entità con caratteristiche profondamente simili (Grafico 4). L'analisi dei *cluster* eseguita nell'ambito dell'ACP è anch'essa un metodo di analisi multivariata dei dati che consente di raggruppare le varie unità statistiche in una serie di gruppi (detti appunto *cluster*). L'obiettivo è quello di pervenire ad una classificazione che risponda a criteri di omogeneità interna e di eterogeneità esterna. La scelta ottimale del numero di gruppi rappresenta un compromesso tra due esigenze opposte: (i) da un lato la volontà di ottenere il minor numero possibile di *cluster*, (ii) dall'altro la necessità di non racchiudere all'interno di uno stesso gruppo entità con caratteristiche profondamente distinte. Nel caso presente, il *cluster* osservato era

indicativo di bassi valori di varianza tra i gruppi proteici espressi da questi animali. Questa condizione potrebbe essere indice di: (i) una popolazione campione omogenea a riprova della rigorosa selezione effettuata; (ii) una affine e limitata attivazione di funzioni biologiche/vie metaboliche con conseguente similare espressione di raggruppamenti proteici. Le differenze osservate nella comparazione inter-gruppo (pretrattamento vs. gruppo sani) erano quindi indicative dell'assenza di un *pathway* specifico direzionale, esito, a sua volta, di marcate disparità esistenti tra le due popolazioni. Anche in questo caso l'ipotesi sembra trovare conferma nell'impossibilità di creare un *network* proteico a *layout* radiale derivante dall'analisi funzionale delle molecole che accomunasse i due gruppi.

Per quanto attiene l'analisi funzionale delle proteine osservate nel presente studio alcuni *cluster* di arricchimento significativi sono stati ottenuti per la comparazione intra-gruppo (post-trattamento vs. pretrattamento, Grafico 5) ma non per quella inter-gruppo (pretrattamento vs. gruppo sani). Un primo insieme di proteine significativamente sovra-esprese era quello legato alla risposta immunitaria e rappresentato da: *A0A3Q2ICR1_Complement C2* (gene C2 e log₂FC 1.27), *A0A3Q2IDD2_Complement C2* (HPX e log₂FC 1.77) e *F6X118_Hemopexin* (CFB e log₂FC 2.88). Le prime due hanno un ruolo riconosciuto nella costituzione del 2° componente del complemento (C2): un fattore associato alla difesa dell'ospite contro microrganismi incapsulati. Come è noto, un'ampia varietà di batteri viene identificata dal sistema del complemento attraverso i suoi primi componenti generando, conseguentemente, il rilascio di prodotti biologicamente attivi e coinvolti nell'opsonizzazione, nel reclutamento dei fagociti e nell'uccisione dei microrganismi.²¹ Alla Hemopexin (emopessina) viene invece attribuita la funzione di legare e trasportare l'*eme* libero al fegato, dove viene internalizzato e degradato, al fine di ridurre lo stress ossidativo mediato dall'*eme* circolante, prevenire le perdite di ferro e rendere quest'ultimo indisponibile per lo sviluppo di popolazioni batteriche potenzialmente nocive.^{22,23} A questo proposito, una funzione protettiva le è stata recentemente attribuita nel pollo dopo l'inoculazione di lipopolisaccaridi (LPS) provenienti da *E. coli*. In questi soggetti, l'emopessina aveva mostrato dei significativi rialzi (dal doppio al triplo del valore basale) tra le 6 e le 12 ore dopo la procedura, raggiungendo un picco entro 24 ore, ma ritornando al

livello basale solo dopo 14 giorni.^{22,23} L'osservazione della sovra-espressione di queste tre proteine a pochi giorni dalla fase acuta della patologia ha permesso di avvalorare quanto ipotizzato in letteratura sulle coliche (da costipazione comprese), ovvero la presenza di uno stato infiammatorio cui possono fare seguito anche eventi di dismicrobismo (fino all'endotossiemia nei casi più severi) legato alla reiterata persistenza dell'*ingesta* nel tratto intestinale occluso che funge da *pabulum* ideale per lo sviluppo batterico.^{24,25}

Altre proteine isolate sono state invece associate al complesso fenomeno della coagulazione ematica. Tra queste vi erano: *A0A061DBP6_Von Willebrand factor* – (gene VWF e log₂FC -0.89), *F6UZ12_Coagulation Factor XIII A Chain* (gene F13A1 e log₂FC -0.89), *F7C7J6_Coagulation Factor XIII B Chain* (gene F13B e log₂FC -0.82), *F7BFT1_Peroxiredoxin 2* (gene PRDX2 e log₂FC -1.30), *A0A3Q2GXX5_fibulin 1* (gene FBLN1 log₂FC -0.69) e *A0A5F5PUE2_Kininogen 1*, l'unica del *cluster* funzionale ad essere sovra-espressa (gene KNG1 e log₂FC 1.95). Il fattore di Von Willebrand è una glicoproteina che ha un ruolo cruciale nell'emostasi primaria dove media sia l'adesione piastrinica al sub-endotelio vascolare danneggiato sia l'aggregazione piastrinica successiva. A seguito di una lesione vascolare acuta, il fattore si lega specificamente al collagene fibrillare di tipo I e III favorendo successivamente il processo di coagulazione.^{26,27} Rialzi temporanei dei suoi livelli basali sono stati associati a casi di infezioni, infiammazioni, traumi e altri stimoli in grado di determinare forte *stress* nell'organismo.^{26,27} Il fattore della coagulazione XIII (FXIII) è invece una trans-glutaminasi che circola in forma tetramerica (FXIII-A₂B₂), costituita da due subunità: A (FXIII-A) e B (FXIII-B). Il FXIII-B funge da proteina trasportatrice ed è essenziale per la stabilizzazione del FXIII-A. Il Fattore XIII accelera la reticolazione della fibrina promuovendo la formazione di un complesso ternario tra il pro-enzima FXIII, il fibrinogeno pro-substrato e la trombina attivatrice. Questo è quindi essenziale per formare un coagulo insolubile e fermare il sanguinamento. In una fase iniziale è in grado di supportare l'adesione piastrinica, stabilizzare la matrice provvisoria, ed immobilizzare batteri eventualmente presenti,²⁸⁻³⁰ in un secondo momento sembra invece essere in grado di stimolare l'angiogenesi mediando l'attivazione del complesso tra il recettore VEGF-2 (VEGFR-2) e αvβ3 sulla superficie delle cellule endoteliali vascolari che a

cascata promuove il processo riparativo.²⁹⁻³⁰ La perossiredossina 2, appartiene alla famiglia delle perossiredossine: perossidasi ubiquitarie cisteina-dipendenti ad azione antiossidante in grado di ridurre significativamente i livelli di perossido di idrogeno, perossidi organici e perossinitrito circolanti prodotti durante i processi infiammatori.³¹ Per quanto riguarda la fibulina -1, essa appartiene alla famiglia delle fibuline: un insieme di proteine intercellulari ampiamente espresse nel tessuto connettivo presente nelle fibre della matrice extracellulare e nelle membrane basali. A queste molecole viene riconosciuta la capacità di legarsi a numerose proteine della matrice extra cellulare tra cui: la fibronectina e la laminina, responsabili a loro volta di altre funzioni biologiche quali la migrazione cellulare embrionale, la crescita ed il differenziamento cellulare. Tuttavia, una quota di tali proteine è presente anche nel torrente circolatorio e a questa è stata associato un ruolo attivo nel processo di emostasi conseguente al loro legame con il fibrinogeno.³² La concomitante sotto-espressione del fattore di Von Willebrand, di quello della coagulazione XIII, della Perossiredossina 2 e della fibulina -1 al momento della dimissione (guarigione clinica) ha permesso di supporre che, all'arruolamento, negli animali sussistesse uno stato infiammatorio, associato ad un danno vascolare e tissutale dovuto all'occlusione in atto la cui entità sembra essersi attenuata al termine della terapia. Il processo di guarigione potrebbe aver innescato il cambiamento funzionale osservato, riducendo la portata del processo coagulativo/riparativo. A conferma di tale ipotesi possono essere presi in considerazione: (i) i reperti clinici ottenuti durante l'esame clinico e caratterizzati da uno stato algico ed infiammatorio con possibili ripercussioni sul circolo di ritorno; (quali aumento frequenza cardiaca e respiratoria, consistenza dura del contenuto intestinale, distensione del viscere, pareti edematose, dolore elicato alla palpazione dell'area); (ii) il comportamento osservato da ulteriori proteine sovra-esprese ed associate al processo coagulativo: il chininogeno 1 e la Beta 2 Glicoproteina 1. La prima è una glicoproteina a catena singola appartenente alla famiglia dei chininogeni, sintetizzati dal fegato e coinvolti: nell'infiammazione di origine batterica (essendo in grado di attenuare degli effetti dei LPS e favorendone l'eliminazione), nella protezione delle cellule dai danni mediante l'inibizione di altre proteasi, nel processo della coagulazione inibendo l'angiogenesi e l'aggregazione dei

trombociti.³³ La seconda, detta β 2-GP1 (gene F6Z041H e $\log_2FC$ 1.34) è una proteina ematica multifunzionale che tra i suoi ruoli annovera una attività inibitrice del processo l'agglutinazione piastrinica mediata dall'adenosina difosfato (ADP). Normalmente, la β 2-GP1 assume un'attività anticoagulante (inibendo i fattori della coagulazione), inibendo completamente il rilascio di serotonina da parte delle piastrine e prevenendo le successive ondate di aggregazione indotte dall'ADP. L'osservazione di una sovra-espressione di questi 2 parametri nei soggetti dimessi sembra quindi avvalorare l'ipotesi che il processo infiammatorio, con le relative conseguenze sopra menzionate, fossero in una fase di remissione.³⁴

Per ciò che concerne il gruppo di proteine legato all'omeostasi dei trigliceridi e colesterolo, questo era formato da: *A0A5F5PEE6 Apolipoprotein E* (gene APOA4 e $\log_2FC$ -0.61), *F7DP84 Apolipoprotein E* (gene APOA5 e $\log_2FC$ -2.94), *F6VBP9 Apolipoprotein E* (gene APOE – $\log_2FC$ -0.83) e *F6ZIP9 Lecithin-cholesterol acyltransferase* (gene LCAT e $\log_2FC$ -0.79). Le tre isoforme di apolipoproteina E sono a vario grado coinvolte nel metabolismo dei lipidi e l'omeostasi del colesterolo (ad esempio, regolano il catabolismo di chilomicroni, lipoproteine a densità molto bassa e lipoproteine a densità bassa), nella coagulazione del sangue, nella risposta immunitaria (attraverso la soppressione della proliferazione delle cellule T, regolazione del funzionamento dei macrofagi) e nella protezione dai processi ossidativi.³⁵ La lecitina colesterolo aciltransferasi è invece un enzima associato alle lipoproteine e caratterizzato sia da un'azione fosfolipasi A2 sia da una aciltransferasi. Questa molecola è essenziale per la normale maturazione, inter-conversione e riarrangiamento di tutte le classi di lipoproteine ed è coinvolta nella via di "trasporto inverso" del colesterolo in eccesso, promuovendone il trasferimento dai tessuti periferici al fegato per l'escrezione.³⁶ La proteina viene sintetizzata dal fegato e permane nel torrente circolatorio legata reversibilmente alle lipoproteine ad alta densità e, in misura minore, alle lipoproteine a bassa densità. Inoltre, questo enzima catalizza l'esterificazione del colesterolo libero sulla superficie delle lipoproteine.³⁶ La differenza intra-gruppo riguardante queste quattro variabili è stata associata alla comparsa di una lipomobilizzazione (dalla periferia al fegato e viceversa) potenzialmente espressione di un bilancio energetico negativo in questi soggetti. Questo fenomeno troverebbe

spiegazione: (i) nell' intrinseca progressività e lentezza delle manifestazioni cliniche della colica da costipazione, che spesso portano gli animali a ridurre la quantità di cibo assunta nell'arco della giornata diverse ore prima che lo stato diventi evidente agli occhi di un proprietario; (ii) al digiuno terapeutico che è stato imposto ai soggetti seppur associato ad una fluidoterapia a supporto. L'iperlipidemia a diversa entità (da lieve a grave) è stata da tempo documentata nel cavallo e può avere luogo entro 48h dalla comparsa di periodi di bilancio energetico negativo spesso dovuti a: intervalli prolungati tra i pasti, alimentazione limitata, patologie anoressizzanti, aumento della richiesta di energia o, di contro, in animali sovrappeso/obesi.^{37,28} Tale condizione sembrerebbe essere confermata anche da una significativa sovra-espressione dell'Apolipoproteina E (gene F7Dp84 e log₂FC 4.09) nei soggetti in fase acuta del confronto inter-gruppo (fase acuta vs. gruppo sani, Tabella 8), confermando la deduzione di una possibile mobilitazione lipidica al momento del ricovero. Il miglioramento della condizione osservato al termine del ricovero potrebbe essere conseguenza sia all'azione della fluido terapia sia alla reintroduzione dell'alimento solido 48 ore prima delle dimissioni. Anche le modifiche dell'assetto lipidico osservato negli animali malati prima del trattamento sembrano confermare tale quadro metabolico. In particolare, i livelli ematici dei trigliceridi sono apparsi più alti nel gruppo malati rispetto al gruppo controllo (P<0.05) con una tendenza alla diminuzione al momento delle dimissioni fino a risultare simili a quelli riscontrati nel gruppo controllo.

Infine, riguardo l'analisi funzionale della comparazione fase acuta (pretrattamento) vs. gruppo controllo (animali sani), la mancanza di *cluster* di arricchimento significativi ha portato a discutere esclusivamente il ruolo di singole proteine che mostravano una affinità con il processo patologico in atto e che si sono espresse significativamente nel confronto tra i due gruppi. Innanzi tutto, l'analisi ha messo in evidenza la presenza di: *F7BFT1_Peroxiredoxin 2* (gene PRDX2 e log₂FC 1.30), *A0A5F5PUE2_Kininogen 1* (gene KNG1 e log₂FC 0.72) e *F7DP84_Apolipoprotein E* (gene APOA5 e log₂FC 4.09). La sovra-espressione di queste molecole nei soggetti fin dalla fase acuta, avvalora ancor più le deduzioni fatte nell'altro confronto (fase acuta vs. guarigione) circa gli effetti delle coliche da costipazione sui processi coagulativi e sul metabolismo lipidico, confermando come

queste vie metabolico/funzionali fossero attive prima del trattamento.

Sempre continuando con l'analisi delle singole molecole, degna di nota è anche la sovra-espressione delle seguenti proteine: *A0A5F5PJN1_Serum amyloid A protein* (gene SAA e $\log_2FC$ 6,28), *077811_lactotransferrin* (gene LTF and $\log_2FC$ 1.90) e di *A0A3Q2HTG2_Fibrinogen alpha chain* (gene FGA e $\log_2FC$ 2,42). L'amiloide sierica A (SAA) è la principale proteina della fase acuta nei cavalli. Viene prodotta durante una reazione sistemica aspecifica a qualsiasi lesione tissutale. Nel sangue dei cavalli sani, la concentrazione di SAA è molto bassa, ma aumenta notevolmente con l'infiammazione; la sua concentrazione aumenta già 6 ore dopo la stimolazione con infezione o lesione tissutale ed entro 24-48 ore può essere fino a 1000 volte la concentrazione iniziale. Quando l'infiammazione si risolve, la concentrazione di SAA diminuisce entro 12 ore.³⁹ La lattotransferrina invece è una proteina appartenente alla famiglia delle transferrine che svolge il suo ruolo biologico nell'ambito del sistema immunitario innato. Questa è in grado di esercitare sia azioni antimicrobiche sia antinfiammatorie mostrando una grande affinità di legame per il ferro, rendendolo così indisponibile per la crescita batterica. La lattotransferrina è dotata anche di attività battericida sempre attraverso meccanismi ferro-dipendenti che ne permettono il legame ai lipopolisaccaridi della membrana microbica ed alterando la permeabilità.⁴⁰⁻⁴³ Anche la sovra-espressione di queste due variabili nei soggetti in fase acuta rispetto a quelli sani sembra in linea con quanto osservato nella precedente comparazione (fase acuta vs. guarigione), confermando la possibilità di un danno tissutale ed un dismicrobismo alla base dell'attivazione della risposta immunitaria/infiammatoria. Tale andamento trova conferma anche a livello ematologico relativamente all'aumento della siero amiloide A. Tale parametro ha infatti evidenziato una differenza significativa nella comparazione tra GM al ricovero vs. GS ($P < 0.05$) ed una tendenza alla diminuzione in quella GM al ricovero vs. GM alle dimissioni (infiammazione in via di risoluzione) che ha portato a sua volta i valori di quest'ultimo tempo di campionamento a non essere differenti da quelli del GS.

Per ciò che concerne la componente alfa del fibrinogeno è invece una glicoproteina trasportata dal sangue e composta da tre paia di catene polipeptidiche non identiche. In seguito a un danno vascolare,

i livelli di fibrinogeno (e conseguentemente di questo componente) aumentano fino a quando non si attiva la sua scissione trombina-dipendente che permette la formazione di fibrina: il componente più abbondante all'interno di un coagulo ematico.⁴⁴ Anche in questo caso, gli alti valori di questa frazione proteica riscontrati nei soggetti al momento del ricovero rispetto ai soggetti sani, sembrano avvalorare l'ipotesi della presenza di uno stato infiammatorio associato alla fase acuta della colica da costipazione del grosso intestino del cavallo, a sua volta associato alla presenza di un danno anatomico-funzionale.

Il presente studio presenta comunque alcuni limiti relativi all'impiego di questa nuova metodica in ambito clinico. *In primis* va contemplato l'esiguo numero di animali che ha costituito la popolazione campione. Sebbene possa essere considerato simile ad altri studi simili presenti in letteratura,⁴⁵ la sua numerosità è stata fortemente condizionata da valutazioni di natura economica legata all'elevato costo delle indagini eseguite. Come conseguenza, nonostante l'analisi abbia permesso di esplicitare alcuni effetti che la colica da costipazione sembri avere su delle specifiche espressioni proteiche, è auspicabile che le ipotesi formulate trovino ulteriori conferme attraverso lo studio di un campione più ampio. Altra considerazione da fare riguarda la difficoltà di applicare una tecnica così avanzata e potente in *trial* clinici di campo, dove raggiungere l'uniformità della popolazione campione può divenire oltremodo complesso e indaginoso. Sicuramente questo tipo di studi, che ha come compito primario osservare i processi biologici connessi a stati patologici nel tentativo di definire *biomarker* che possano permettere lo sviluppo di nuovi test diagnostici specifici, trova la sua massima espressione in condizioni dichiaratamente sperimentali che permettono una forte riduzione della variabilità intraspecifica. Tuttavia, anche quest'ultime non sono scevre da problematiche legate alla difficile trasposizione dei risultati in condizioni reali in cui si possono osservare quadri patologici simili (ma non esattamente uguali) o soggetti arruolati una storia clinica difficilmente uniformabile. Tutto ciò crea delle importanti variabili in grado di condizionare i risultati ottenuti rendendone complessa l'interpretazione. Come fatto nello studio, il ricorso a severi criteri di

eleggibilità può rappresentare un buon compromesso per ottenere dati che possano essere rappresentativi della popolazione campione e che permettano di orientare studi futuri.

Relativamente all'applicabilità della proteomica in ambito clinico, lo studio conferma la precisione della metodica ma i numerosissimi gruppi proteici contemporaneamente espressi hanno reso l'interpretazione dell'analisi funzionale indagativa e non sempre chiarificatrice, data la complessità dei processi biologici in atto. Discernere tra la mole di proteine ottenute richiede uno studio approfondito e meticoloso delle vie metabolico-funzionali della specie esaminata, senza necessariamente avere un riscontro clinico reale del problema. La valutazione delle modifiche dei processi può essere talmente precoce da non avere delle manifestazioni cliniche corrispondenti a tali cambiamenti creando una sorta di dissociazione tra loro. A questo va aggiunto anche la modalità rappresentazione del risultato (in $\log_2FC$, una mera sovra- o sotto-espressione del parametro rispetto ad uno stato di partenza) non quantifica il danno biologico sottostante, dato che, queste variazioni, potrebbero verificarsi senza che metodiche diagnostiche più comuni (ad esempio esami emato-biochimici, ecc.) abbiano mostrato delle alterazioni. Da qui la necessità di avere dei valori di riferimento clinico-diagnostici che permettano di definire dove posizionare le informazioni rispetto allo stato di salute di un soggetto.

CONCLUSIONI

Lo studio condotto ha permesso di identificare e caratterizzare delle proteine funzionali espresse in cavalli affetti da colica da costipazione del grosso intestino mediante proteomica LC-MS/MS. Delle differenze nella manifestazione biomolecolare della risposta immunitaria, coagulazione ematica, attività antiossidante, biosintesi ed omeostasi dei lipidi sono state osservate prima e dopo l'applicazione di una terapia conservativa convenzionale. Tra animali in fase acuta e quelli sani l'analisi funzionale delle proteine espresse non ha permesso raggruppamenti di arricchimento significativi, sebbene siano state osservate delle differenze legate a delle singole proteine coinvolte nella risposta immunitaria innata e nella coagulazione. L'analisi proteomica si è rivelata un eccellente strumento per la scoperta di biomarcatori per la valutazione dell'efficacia della terapia attuata, mentre meno incoraggianti sono stati i risultati che valutavano la possibilità di fare diagnosi precoce di questo tipo di colica. Tuttavia, la metodica ha permesso di formulare, nel complesso, ipotesi interessanti riguardanti la contemporanea presenza di un danno tissutale, dismicrobismo intestinale associato a stato infiammatorio, e mobilizzazione lipidica nei cavalli affetti da colica da costipazione. In particolare quest'ultimi due aspetti sono stati confermati anche attraverso le indagini ematobiochimiche che evidenziano uno stato infiammatorio generale associato ad iperlipidemia.

Ulteriori studi sono auspicabili sia per confermare le ipotesi su una popolazione campione più ampia, sia per comparare i risultati ottenuti con coliche di altra natura al fine di comprendere la specificità dei potenziali *biomarker* isolati.

Bibliografia

1. EMA, European Medicine Agency. VICH GL9: Guideline on good clinical practice. 2021. <https://www.ema.europa.eu/en/vich-gl9-goodclinical-practices>. Accessed 10 Jun 2021.
2. Micaela Sgorbini, Francesco Ferrucci, Irene Nocera, Valentina Vitale, Giovanni Stancari. Esame clinico del Cavallo e del Puledro in Ciaramella P, Semeiotica Medica Veterinaria. 1° edizione 2014, Poletto Editore srl, Vermezzo (MI). Capitolo 20, pag 506-14.
3. Ciaramella P. Esame Obiettivo Generale. in Ciaramella P, Semeiotica Medica Veterinaria. 1° edizione 2014, Poletto Editore srl, Vermezzo (MI). Capitolo 8, pag 60-120.
4. le Jeune S, Whitcomb MB. Ultrasound of the equine acute abdomen. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 2014 Aug;30(2):353-81, viii. doi: 10.1016/j.cveq.2014.04.011.
5. Londoño AS, Manual of Clinical Procedures in the Horse, First Edition, Editor(s): Lais R, R Costa, Mary Rose Paradis, Chapter 14, Nasogastric Intubation.
6. Plummer AE. Impactions of the small and large intestines. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 2009 Aug;25(2):317-27. doi: 10.1016/j.cveq.2009.04.002.
7. Proteominer®, BioRad, Protein Enrichment Introductory Small-Capacity. Segrate (MI), Italy. Instruction Manual <https://www.biorad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10010636D.PDF> . Accesso al sito web in data: 15 Gennaio 2022
8. S-trap™, ProtiFi, Micro Spin Column Digestion. Fairport, United States of America. Protocol <https://files.protifi.com/protocols/s-trap-micro-long-4-7.pdf> . Accesso al sito web in data: 15 Gennaio 2022
9. Cox, J. & Mann, M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nature Biotechnology* 26, 1367–1372 (2008).
10. Tyanova, Stefka, Tikira Temu, Pavel Sinitsyn, Arthur Carlson, Marco Y Hein, Tamar Geiger, Matthias Mann, and Jürgen Cox. 2016. "The Perseus Computational Platform for Comprehensive Analysis of (Prote)omics Data." *Nature Methods* 13 (9): 731–40. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3901>.
11. Lönker NS, Fechner K, Wahed AAE. Horses as a Crucial Part of One Health. *Vet Sci.* 2020 Feb 29;7(1):28. doi: 10.3390/vetsci7010028.
12. Lees P, Toutain PL. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, metabolism, toxicology and residues of phenylbutazone in humans and horses. *Vet J.* 2013 Jun;196(3):294-303. doi: 10.1016/j.tvjl.2013.04.019.
13. Hurcombe SDA. Clinical Pathology of the Racehorse. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 2020 Apr;36(1):135-145. doi: 10.1016/j.cveq.2019.12.004.
14. Csősz É, Kalló G, Márkus B, Deák E, Csutak A, Tőzsér J. Quantitative body fluid proteomics in medicine - A focus on minimal invasiveness. *J Proteomics.* 2017 Feb 5;153:30-43. doi: 10.1016/j.jprot.2016.08.009.
15. Zhao M, Yang Y, Guo Z, Shao C, Sun H, Zhang Y, Sun Y, Liu Y, Song Y, Zhang L, Li Q, Liu J, Li M, Gao Y, Sun W. A Comparative Proteomics Analysis of Five Body Fluids: Plasma, Urine, Cerebrospinal Fluid, Amniotic Fluid, and Saliva. *Proteomics Clin Appl.* 2018 Nov;12(6):e1800008. doi: 10.1002/prca.201800008.
16. D'Ambrosio C, Arena S, Talamo F, Ledda L, Renzone G, Ferrara L, Scaloni A. Comparative proteomic analysis of mammalian animal tissues and body fluids: bovine proteome database. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2005 Feb 5;815(1-2):157-68. doi: 10.1016/j.jchromb.2004.07.017.
17. Gianazza E, Wait R, Eberini I, Sensi C, Sironi L, Miller I. Proteomics of rat biological fluids--the tenth anniversary update. *J Proteomics.* 2012 Jun 18;75(11):3113-28. doi: 10.1016/j.jprot.2012.03.053.

18. Miller I, Schlosser S, Palazzolo L, Veronesi MC, Eberini I, Gianazza E. Some more about dogs: Proteomics of neglected biological fluids. *J Proteomics*. 2020 Apr 30;218:103724. doi: 10.1016/j.jprot.2020.103724.
19. Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, Appel RD, Humphrey-Smith I, Hochstrasser DF, Williams KL. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev*. 1996;13:19-50. doi: 10.1080/02648725.1996.10647923.
20. Holman JD, Dasari S, Tabb DL. Informatics of protein and posttranslational modification detection via shotgun proteomics. *Methods Mol Biol*. 2013;1002:167-79. doi: 10.1007/978-1-62703-360-2_14.
21. Chandrasekhar K, Dileep A, Lebonah DE, Kumari JP. A short review on proteomics and its applications. *Int Lett Nat Sci* 17: 77–84. doi.org/10.56431/p-avsz0g
22. Hanash S. Disease proteomics. *Nature*. 2003 Mar 13;422(6928):226-32. doi: 10.1038/nature01514. PMID: 12634796.
23. Banks RE, Dunn MJ, Hochstrasser DF, Sanchez JC, Blackstock W, Pappin DJ, Selby PJ. Proteomics: new perspectives, new biomedical opportunities. *Lancet*. 2000 Nov 18;356(9243):1749-56. doi: 10.1016/S0140-6736(00)03214-1.
24. Hinsby AM, Olsen JV, Bennett KL, Mann M. Signaling initiated by overexpression of the fibroblast growth factor receptor-1 investigated by mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*. 2003 Jan;2(1):29-36. doi: 10.1074/mcp.m200075-mcp200.
25. Lai CC, Tsai CH, Tsai FJ, Lee CC, Lin WD. Rapid monitoring assay of congenital adrenal hyperplasia with microbore high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry from dried blood spots. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2001;15(22):2145-51. doi: 10.1002/rcm.493.
26. Pastwa E, Somiari SB, Czyz M, Somiari RI. Proteomics in human cancer research. *Proteomics Clin Appl*. 2007 Jan;1(1):4-17. doi: 10.1002/prca.200600369.
27. Martin DB, Nelson PS. From genomics to proteomics: techniques and applications in cancer research. *Trends Cell Biol*. 2001 Nov;11(11):S60-5. doi: 10.1016/s0962-8924(01)02123-7.
28. Rabilloud T, Lelong C. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: a tutorial. *J Proteomics*. 2011 Sep 6;74(10):1829-41. doi: 10.1016/j.jprot.2011.05.040.
29. Southan C. Last rolls of the yoyo: Assessing the human canonical protein count. *F1000Res*. 2017 Apr 7;6:448. doi: 10.12688/f1000research.11119.1.
30. Groth D, Hartmann S, Klie S, Selbig J. Principal components analysis. *Methods Mol Biol*. 2013;930:527-47. doi: 10.1007/978-1-62703-059-5_22. PMID: 23086856.
31. Tedesco F. Inherited complement deficiencies and bacterial infections. *Vaccine*. 2008 Dec 30;26 Suppl 8:I3-8. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.11.010.
32. Li Y, Chen R, Wang C, Deng J, Luo S. Double-edged functions of hemopexin in hematological related diseases: from basic mechanisms to clinical application. *Front Immunol*. 2023 Nov 1;14:1274333. doi: 10.3389/fimmu.2023.1274333.
33. Montecinos L, Eskew JD, Smith A. What Is Next in This "Age" of Heme-Driven Pathology and Protection by Hemopexin? An Update and Links with Iron. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2019 Sep 24;12(4):144. doi: 10.3390/ph12040144.
34. Hegde S, Lin YM, Golovko G, Khanipov K, Cong Y, Savidge T, Fofanov Y, Shi XZ. Microbiota dysbiosis and its pathophysiological significance in bowel obstruction. *Sci Rep*. 2018 Sep 3;8(1):13044. doi: 10.1038/s41598-018-31033-0.
35. Clarke LL, Roberts MC, Argenzio RA. Feeding and digestive problems in horses. Physiologic responses to a concentrated meal. *Vet Clin North Am Equine Pract*. 1990 Aug;6(2):433-50. doi: 10.1016/s0749-0739(17)30550-3.

36. Hassan MI, Saxena A, Ahmad F. Structure and function of von Willebrand factor. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2012 Jan;23(1):11-22. doi: 10.1097/MBC.0b013e32834cb35d.
37. Peyvandi F, Garagiola I, Baronciani L. Role of von Willebrand factor in the haemostasis. *Blood Transfus*. 2011 May;9 Suppl 2(Suppl 2):s3-8. doi: 10.2450/2011.002S.
38. Bagoly Z, Katona E, Muszbek L. Factor XIII and inflammatory cells. *Thromb Res*. 2012 May;129 Suppl 2:S77-81. doi: 10.1016/j.thromres.2012.02.040. Epub 2012 Mar 15.
39. Muszbek L, Bereczky Z, Bagoly Z, Komáromi I, Katona É. Factor XIII: a coagulation factor with multiple plasmatic and cellular functions. *Physiol Rev*. 2011 Jul;91(3):931-72. doi: 10.1152/physrev.00016.2010.
40. Shi DY, Wang SJ. Advances of Coagulation Factor XIII. *Chin Med J (Engl)*. 2017 Jan 20;130(2):219-223. doi: 10.4103/0366-6999.198007.
41. Sadowska-Bartosz I, Bartosz G. Peroxiredoxin 2: An Important Element of the Antioxidant Defense of the Erythrocyte. *Antioxidants (Basel)*. 2023 Apr 27;12(5):1012. doi: 10.3390/antiox12051012.
42. Tran H, Tanaka A, Litvinovich SV, Medved LV, Haudenschild CC, Argraves WS. The interaction of fibulin-1 with fibrinogen. A potential role in hemostasis and thrombosis. *J Biol Chem*. 1995 Aug 18;270(33):19458-64. doi: 10.1074/jbc.270.33.19458.33.
43. Yang A, Xie Z, Wang B, Colman RW, Dai J, Wu Y. An essential role of high-molecular-weight kininogen in endotoxemia. *J Exp Med*. 2017 Sep 4;214(9):2649-2670. doi: 10.1084/jem.20161900. Epub 2017 Aug 9. Erratum in: *J Exp Med*. 2019 Jan 7;216(1):244. PMID: 28794132; PMCID: PMC5584120.
44. McDonnell T, Wincup C, Buchholz I, Pericleous C, Giles I, Ripoll V, Cohen H, Delcea M, Rahman A. The role of beta-2-glycoprotein I in health and disease associating structure with function: More than just APS. *Blood Rev*. 2020 Jan;39:100610. doi: 10.1016/j.blre.2019.100610.
45. Chen F, Ke Q, Wei W, Cui L, Wang Y. Apolipoprotein E and viral infection: Risks and Mechanisms. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2023 Jul 28;33:529-542. doi: 10.1016/j.omtn.2023.07.031.
46. Rousset X, Shamburek R, Vaisman B, Amar M, Remaley AT. Lecithin cholesterol acyltransferase: an anti- or pro-atherogenic factor? *Curr Atheroscler Rep*. 2011 Jun;13(3):249-56. doi: 10.1007/s11883-011-0171-6.
47. Seifi HA., Gray H, Mohri M, Badiiee, A. Hyperlipidemia in Caspian miniature horses: effects of undernutrition. *J Equine Vet Sci*. 2002. 22(5):205-7 doi.org/10.1016/S0737-0806(02)70033-6
48. Dunkel B, Wilford SA, Parkinson NJ, Ward C, Smith P, Grahame L, Brazil T, Schott HC 2nd. Severe hypertriglyceridaemia in horses and ponies with endocrine disorders. *Equine Vet J*. 2014 Jan;46(1):118-22. doi: 10.1111/evj.12089.
49. Witkowska-Piłaszewicz OD, Żmigrodzka M, Winnicka A, Miśkiewicz A, Strzelec K, Cywińska A. Serum amyloid A in equine health and disease. *Equine Vet J*. 2019 May;51(3):293-298. doi: 10.1111/evj.13062.
50. van Hooijdonk AC, Kussendrager KD, Steijns JM. In vivo antimicrobial and antiviral activity of components in bovine milk and colostrum involved in non-specific defence. *Br J Nutr*. 2000 Nov;84 Suppl 1:S127-34. doi: 10.1017/s000711450000235x.
51. Legrand D, Ellass E, Pierce A, Mazurier J. Lactoferrin and host defence: an overview of its immuno-modulating and anti-inflammatory properties. *Biometals*. 2004 Jun;17(3):225-9. doi: 10.1023/b:biom.0000027696.48707.42

52. Holloway NM, Lakritz J, Tyler JW, Carlson SL. Serum lactoferrin concentrations in colostrum-fed calves. *Am J Vet Res.* 2002 Apr;63(4):476-8. doi: 10.2460/ajvr.2002.63.476.
53. Thomas NJ, Carcillo JA, Doughty LA, Sasser H, Heine RP. Plasma concentrations of defensins and lactoferrin in children with severe sepsis. *Pediatr Infect Dis J.* 2002 Jan;21(1):34-8. doi: 10.1097/00006454-200201000-00008.
54. Soria J, Mirshahi S, Mirshahi SQ, Varin R, Pritchard LL, Soria C, Mirshahi M. Fibrinogen α C domain: Its importance in physiopathology. *Res Pract Thromb Haemost.* 2019 Feb 15;3(2):173-183. doi: 10.1002/rth2.12183.
55. Donnelly CG, Johnson AL, Reed S, Finno CJ. Cerebrospinal fluid and serum proteomic profiles accurately distinguish neuroaxonal dystrophy from cervical vertebral compressive myelopathy in horses. *J Vet Intern Med.* 2023 Mar;37(2):689-696. doi: 10.1111/jvim.16660.
56. Williams ZJ, Velez-Irizarry D, Gardner K, Valberg SJ. Integrated proteomic and transcriptomic profiling identifies aberrant gene and protein expression in the sarcomere, mitochondrial complex I, and the extracellular matrix in Warmblood horses with myofibrillar myopathy. *BMC Genomi*

