



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



Tesi di Dottorato

**“Valutazione delle performances
in cavalli di razza Trottatore Italiano
PCR positivi a *Theileria equi*”**

Candidato

Dott. Pierpaolo Coluccia

Tutor

Prof.ssa Maria Pia Pasolini

Coordinatore

Prof. Giuseppe Cringoli

A chi ci fa sentire vivi

Lista delle abbreviazioni	11
Lista delle figure	15
Lista delle tabelle	17
Abstract	19
Introduzione	23
Capitolo 1 - Patologie muscoloscheletriche nella sindrome da scarso rendimento del cavallo sportivo	27
1.1 La sindrome da scarso rendimento	29
1.2 Patologie osteocondrali e sindrome da scarso rendimento	31
1.3 Lesioni traumatiche e sindrome da scarso rendimento	35
1.4 Miopatie e sindrome da scarso rendimento	37
Bibliografia	40
Capitolo 2 - I disordini muscoloscheletrici nel cavallo	45
2.1 Cause muscolari di scarso rendimento	49
2.2 Iter diagnostico in caso di sospetto di patologia muscolare	53
2.2.1 Elettromiografia	54
2.2.2 Biopsia muscolare	55
2.3 Miopatie infiammatorie e parassitarie	58
2.3.1 Miositi parassitarie	58
2.3.1.1 Sarcocisti	58
2.3.1.2 Trichinella Spiralis	59
2.3.2 Miopatie infiammatorie e necrotizzanti del cavallo	60
2.3.2.1 Miosite da Clostridi	60
2.3.2.2 Miopatia da Streptococco acuta grave associata a rabdomiolisi	61
2.3.2.3 Miositi di origine virale	62
2.3.2.4 Miopatia da Anaplasma	62
2.3.2.5 Porpora emorragica ed infartuale	62
2.3.3 Miosite immuno-mediata	63

2.3.4	Miopatia immuno-mediata da <i>Theileria equi</i> e <i>Babesia caballi</i>	65
	Bibliografia	66
Capitolo 3 - La Piroplasmosi Equina		71
3.1	Background	75
3.2	Eziologia e ciclo biologico	76
3.2.1	<i>Theileria equi</i>	77
3.2.2	<i>Babesia Caballi</i>	78
3.3	Distribuzione	79
3.3.1	Epidemiologia in Italia	82
3.4	Infezione	85
3.5	Patogenesi	86
3.6	Segni clinici	88
3.7	Patologia	89
3.8	Diagnosi	90
3.8.1	Diagnosi differenziale	91
3.9	Immunità	92
3.10	Risposta immunitaria in corso di Babesiosi	93
3.10.1	Risposta cellulo-mediata	93
3.10.2	Principali citochine prodotte in corso di babesiosi	94
3.10.3	Risposta umorale	96
3.11	Terapia	98
	Bibliografia	100
Chapter 4 - Performances evaluation in Italian Standardbred horses PCR positive to <i>Theileria equi</i>		111
4.1	Introduction	113
4.2	Materials and Methods	114
4.2.1	Blood collection	115
4.2.2	Hematology and Serum Biochemistry	116
4.2.3	Molecular tests	116
4.2.3.1	DNA extraction	116
4.2.3.2	Real time PCR for <i>B. caballi</i> and <i>T. equi</i>	117
4.2.3.3	Sequencing	117
4.2.4	Performances evaluation	118

4.2.5	Statistical Analysis	118
4.3	Results	119
4.3.1	PCR results	119
4.3.2	Performances	121
4.3.3	Muscle atrophy	121
4.3.4	Haematology and serum biochemistry parameters	124
4.4	Discussion	128
4.5	Conclusions	133
	References	134

AAEP	American Association of Equine Practitioners
ALP o ALPK	Fosfatasi alcalina
ALT o GPT	Alanina aminotransferasi
APC	Antigen presenting cells (Cellule presentanti l'antigene)
AST o GOT	Aspartato transaminasi
ATP	Adenosina trifosfato
<i>B. caballi</i>	<i>Babesia caballi</i>
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BUN	Blood Urea Nitrogen (Indice di azoto ureico)
CBC	Complete blood count (Esame emocromocitometrico)
CD4+	Linfociti T helper CD4+ (cluster of differentiation 4)
CD8+	Linfociti T citotossici (cluster of differentiation 8)
CFT	Complement fixation test (Prova di fissazione del complemento)
CK o CPK	Creatinchinasi o Creatina fosfochinasi
COX	Citocromossidasi
CRF	Case Report Form (Scheda per la raccolta dei dati)
DM	Dermatomyositis (Dermatomiosite)
DNA	DeoxyriboNucleic Acid (Acido de(s)ossiribonucleico)
EDTA	Acido etilendiamminotetraacetico
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay (Test immuno-assorbente legato ad un enzima)
EMG	Elettromiografia
EMND	Equine motor neuron disease (Malattia da motoneurone degli equini)
EP	Equine Piroplasmosis (Piroplasmosi equina)
ER	Exertional rhabdomyolysis (Rabdomiolisi da sforzo)
GGT	γ -glutamilttransferasi
GLM	General Linear Model (Modello lineare generalizzato)
HIV	Virus dell'immunodeficienza umana
HLA	Human leucocyte antigen (Antigene leucocitario umano)
HYPP	Hyperkalemic periodic paralysis (Paralisi periodica ipercaliemica)
IBM	Inclusion body myositis (Miosite da corpi inclusi)
ID	Imidocarb dipropionate (Imidocarb dipropionato)
IFA o IFAT	Indirect fluorescent antibody assay (Prova di immunofluorescenza indiretta)
IFN- γ	Interferone gamma

IGF-1	Insulin growth factor 1
IL-1	Interleuchina 1
IL-6	Interleuchina 6
IL-10	Interleuchina 10
im	Intramuscolo
IM	Inflammatory myopathies (Miopatie infiammatorie)
IMM	Immunomediated myositis (Miosite immunomediata)
IS	Italian Standardbreed (Trottatore Italiano)
IZSLT	Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana
KO	Knock-out genico
LDH	Lattato deidrogenasi
MCH I	Complesso maggiore di istocompatibilità di classe I
MCH II	Complesso maggiore di istocompatibilità di classe II
mDNA	DNA mitocondriale
NADH-TR	Adenindinucleotide-tetrazolioreduttasi
Neg	Negative
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NF-kB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NO	Ossido Nitrico
OCD	Osteocondrosi dissecante
PAS	Acido periodico - reattivo di Schiff
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reazione a catena della polimerasi)
PM	Polymyositis (Polimiosite)
Pos	Positive
PSSM	Polysaccharide storage myopathy (Miopatia da accumulo di polisaccaridi)
ROM	Range of motion
ROS	Reactive oxygen species (Specie reattive dell'ossigeno)
rtPCR	Real time Polymerase Chain Reaction
SDFT	Superficial Digital Flexor Tendon (Tendine del flessore superficiale del dito)
SDH	Succinato deidrogenasi
SeM	Streptococcus equi M-like proteins
sIBM	Sporadic inclusion body myositis (Miosite sporadica da corpi inclusi)

sp.	specie
spp.	several species (più specie)
<i>T. equi</i>	<i>Theileria equi</i>
TNF- α	Tumor necrosis factor α (Fattore di necrosi tumorale α)
TPR	Tiro Pesante Rapido
VitEM	Miopatia da carenza di vitamina E (Vitamin E-deficient myopathy)
VO ₂ max	Massima potenza aerobica (massimo consumo di ossigeno)
WAHID	World Animal Health Information Database

- 2.1 Cause muscolari di scarso rendimento
- 2.2 Cause di atrofia muscolare focale e generalizzata e test diagnostici consigliati
- 3.1 Ciclo biologico di *B. caballi* e *T. equi*. In quest'ultima manca la trasmissione transovarica e può essere presente uno stadio pre-eritrocitario nei linfociti
- 3.2 Sangue equino contenente un singolo organismo intra-eritrocitario di *T. equi* (in alto) ed una croce di Malta formata da quattro organismi (in basso). (Colorazione Wright - Giemsa) (da Veterinary hematology - A diagnostic guide and color atlas. Harvey. Elsevier-Saunders. 2001).
- 3.3 Due organismi piriformi di *Babesia caballi* in un eritrocita equino nella caratteristica disposizione ad angolo (Diff-Quik®, x100 oil magnification, colorazione Wright - Giemsa)
- 3.4 Distribuzione mondiale della piroplasmosi equina (Fonte OIE, WAHID. Periodo: gennaio 2016 - settembre 2018 modificato)
- 3.5 Influenza delle citochine sulle condizioni che determinano la limitata disponibilità di ossigeno e la ridotta funzionalità mitocondriale in corso di infezione malarica (da Clark, 2006 modificato)
- 4.1 Case Report Form
- 4.2 Power estimation and sample size determination
- 4.3 Prevalence of *T. equi* in Pos and Neg groups
- 4.4 Age and PCR positivity to *T. equi*
- 4.5 Effect of the stable on the muscle atrophy in Neg group (P=0.001)
- 4.6a Atrophy score and number of starts in Pos group horses (P=0.0022)
- 4.6b Atrophy score and placed races in Pos group horses (P=0.0043)
- 4.6c Atrophy score and victories in Pos group horses (P=0.0043)
- 4.6d Atrophy score and mean racing speed in Pos group horses (P=0.0009)
- 4.6e Atrophy score and best time in Pos group horses (P=0.0005)
- 4.6f Atrophy score and total earnings in Pos group horses (P=0.043)
- 4.7a PCR positivity/negativity and ALKP activity (P=0.0001)
- 4.7b PCR positivity/negativity and HGB concentration (P=0.02)

- 2.1 Cause di miopatia nel cavallo
- 4.1 Signalment data and atrophy scores in Pos and Neg groups
- 4.2 Performances mean values in Pos and Neg groups
- 4.3 Mean haematology and serum biochemistry values
- 4.4 Age-related variation in haematology and serum biochemistry parameters

Equine Piroplasmosis (EP) is an infectious tick-borne disease, endemic in many Italian regions. The causal agents of the disease are two haemoprotozoa affecting horses: *Theileria equi* and *Babesia caballi*. Even if the chronic form is accompanied by hardly noticeable symptomatology, seropositive racehorses can show decrease in performance if compared with seronegative ones. In this prospective study we aimed to evaluate the prevalence of PCR positivity to *T. equi* and *B. caballi* in clinically healthy Italian Standardbred (IS) race horses, to compare the performances between PCR positive and negative horses and to investigate the possibly presence of an inflammatory myopathy causing poor performance in PCR positive horses.

The study included 130 IS horses, 45 females, 85 males, from 7 stables in the Campania region (Southern Italy), aged from 3 to 11 years, that were in full training. A score was given to quantify the development of the muscles of the croup and thigh using a scale from 0 to 3, where 0 indicated the absence of atrophy, 1 mild, 2 moderate and 3 severe atrophy. Blood sampling were performed for complete blood count (CBC) and PCR for *T. equi* and *B. caballi*. To assess the performances, the number of starts, placed races, victories, best time, mean of times of the last kilometre (m/s), mean of earnings and total earnings in last 30 races prior to blood sampling were recorded.

A multivariate General Linear Model (GLM) was used to examine any association existing between signalment data, PCR results, performances, muscle atrophy, haematology and serum biochemistry values. Whenever an effect resulted significant, it was further analysed by Mann-Whitney's *U* test or Student's *t* test, for dichotomous comparisons. ANOVA or a Kruskal-Wallis test was applied when the comparison was between more than two levels. For the haematology and serum biochemistry parameters influenced by age and/or body weight, the correlations were calculated using the Pearson's product moment test (*r*) or the Spearman's rank correlation test (*r_s*), depending on the data distribution.

A percentage of 36,3% horses were positive to *T. equi* whereas all samples resulted negative to *B. caballi*. Age and gender affect the prevalence in the present study and mares showed a higher resistance to *T. equi* infection than males while PCR-positivity is statistically higher in older horses.

The performances, haematology and serum biochemistry values did not significantly differ in positive PCR IS compared to negative ones. The gender and PCR positivity/negativity did not show any influence on performances and both the mean racing speed, best time, number of starts

and placements, increased with age. The presence of a correlation between atrophy score and stable only in Neg group horses probably imply a management effect on muscle development, that disappear in PCR positive horses. A moderate muscle atrophy led a decrease in performances if related to not atrophic PCR positive horses. Signalment data like age, gender and body weight, but not PCR positivity/negativity, showed a significant influence on haematology and serum biochemistry parameters.

The amyotrophy highlighted in PCR positive horses, probably subsequent to an autoimmune myositis, may represent the earliest sign of losing the immune balance between host and parasite, which can be expressed with a reduction in athletic performances. Without clinical and laboratory parameters indicative of infection, only specific diagnostic tests (IFAT and PCR) can allow early identification and therapy of positive horses. The use of muscle biopsies in the diagnostic procedures in positive horses could allow an early identification of autoimmune myositis and indicate the possibility of pharmacological treatment for a parasitic sterilization.

La Piroplasmosi Equina (EP) è una malattia infettiva trasmessa dal morso di zecca, endemica in molte regioni italiane. Gli agenti causali della patologia sono due emoprotozoi che parassitizzano il cavallo: *Theileria equi* e *Babesia caballi*. Anche se la forma cronica si accompagna ad una sintomatologia scarsamente evidente, i cavalli da corsa sieropositivi possono mostrare una diminuzione delle prestazioni atletiche al contrario dei sieronegativi. In questo studio prospettico lo scopo è stato quello di valutare la positività alla PCR per *T. equi* e *B. caballi* in cavalli sportivi di razza Trottatore Italiano (IS) clinicamente sani, comparare le performance tra cavalli PCR positivi e negativi e valutare la possibile presenza di una miopatia infiammatoria concomitante responsabile di scarso rendimento nei cavalli PCR positivi.

Lo studio ha incluso 130 cavalli Trottatori Italiani in pieno allenamento, 45 femmine e 85 maschi, stabulati in 7 diverse scuderie insistenti sul territorio campano e di età compresa tra i 3 e gli 11 anni. È stato assegnato uno score per quantificare lo sviluppo della groppa e della coscia mediante una scala da 0 a 3, dove 0 indicava l'assenza di atrofia, 1 lieve, 2 moderata e 3 grave atrofia. Prelievi ematici sono stati effettuati per la valutazione degli esami emocromocitometrico, biochimico e rtPCR per *T. equi* e *B. caballi*. Per valutare le prestazioni, sono stati registrati: il numero di partenze, i piazzamenti, le vittorie, la media dei tempi nell'ultimo chilometro (m/s), il record, le somme vinte medie e totali nelle 30 gare precedenti il prelievo ematico.

Un Modello lineare Generalizzato (GLM) è stato utilizzato per esaminare tutte le associazioni esistenti tra dati di segnalamento, PCR, prestazioni, atrofia muscolare e valori ematobiochimici. Ogni volta che un effetto risultava significativo è stato analizzato mediante test di Mann-Whitney o *t* di Student, per comparazioni dicotomiche. L'ANOVA o il test di Kruskal-Wallis sono stati applicati quando le comparazioni erano effettuate tra più di due livelli. Per i parametri ematobiochimici influenzati dall'età e/o dal peso, le correlazioni sono state calcolate usando il test di Pearson (*r*) o la correlazione per ranghi di Spearman (*r_s*), a seconda della distribuzione dei dati.

Il 36,3% dei cavalli risultavano positivi a *T. equi* mentre tutti i campioni erano negativi a *B. caballi*. La prevalenza era influenzata da età e sesso e le femmine mostravano una più alta resistenza all'infezione da *T. equi* rispetto ai maschi, inoltre la positività alla PCR era statisticamente più alta nei cavalli più anziani.

Le prestazioni ed i valori ematobiochimici non risultavano significativamente differenti tra cavalli positivi e negativi. Il sesso e la

positività/negatività alla PCR non mostravano alcuna influenza sulle performances e sia la media dei tempi nell'ultimo chilometro, sia il record, il numero di partenze ed il numero di piazzamenti, aumentavano all'aumentare dell'età.

La presenza di una correlazione tra atrofia muscolare e le diverse scuderie evidente solo nel gruppo dei cavalli negativi probabilmente indica un effetto del management sullo sviluppo muscolare, che però sparisce nei soggetti PCR positivi. Un grado di atrofia muscolare moderato determina una diminuzione delle prestazioni atletiche se comparato ai cavalli PCR negativi. Solo i dati di segnalamento, ma non il carattere di positività/negatività, mostravano un'influenza significativa sui parametri ematobiochimici.

L'amiotrofia evidenziata nei cavalli PCR positivi, probabilmente secondaria ad un miosite immunomediata, potrebbe rappresentare un segno precoce della perdita dell'equilibrio tra ospite e parassita, che si può esprimere con una diminuzione delle prestazioni. In assenza di parametri clinici e di laboratorio indicativi di infezione, solo i test diagnostici specifici (IFAT e PCR) possono permettere un'identificazione precoce e, dunque, l'approntamento della terapia nei cavalli positivi. L'inclusione della biopsia muscolare tra le procedure diagnostiche volte a valutare i cavalli positivi potrebbe permettere l'identificazione precoce di una miosite immunomediata ed indicare la possibilità della sterilizzazione parassitaria mediante trattamento farmacologico.

Il bello degli sport equestri è che non ci si affida ad un oggetto inanimato come accade nel football con la palla, ma ad un cavallo, ad un altro corpo e ad un'altra mente. È proprio il rapporto con un essere vivente, la fiducia reciproca, le gioie dei successi che si alternano a momenti in cui le cose semplicemente non vanno come si era programmato a renderli così avvincenti. La situazione diventa preoccupante quando quelli che sono solo momenti si trasformano in una serie di risultati mediocri.

Tralasciando le possibili incapacità individuali nel concorrere ad un certo livello, il presentarsi di performances inaccettabili in cavalli naturalmente portati ed addestrati per un certo tipo di competizioni può essere classificato come scarso rendimento.

I problemi di prestazione possono generalmente essere suddivisi in problemi di dieta, allenamento o salute; tre fattori imprescindibili l'uno dall'altro.

È importante ricordare, inoltre, che i cavalli sono stati allevati e selezionati allo scopo di produrre atleti d'élite, con una fisiologia che si è adattata in modo ottimale alla loro funzione. Per questo motivo, anche piccoli cambiamenti nella dieta, nello stato di salute, nella forma fisica o nell'allenamento possono influire significativamente sulle prestazioni. La sfida del clinico consiste nell'identificare questi cambiamenti, soprattutto se di minima entità o se la compromissione delle prestazioni è di origine multifattoriale. Per fare questo spesso è necessaria una collaborazione tra veterinario, istruttore/allenatore e driver/cavaliere.

Dieta e allenamento a parte, la causa clinica più frequente di scarso rendimento è indubbiamente un problema a livello di apparato muscolo-scheletrico, il cui buon funzionamento è essenziale per il successo delle prestazioni atletiche. Anche piccoli squilibri nella funzione muscolare locomotoria quali zoppia, rigidità al collo, schiena o pelvi influenzeranno la potenza, la coordinazione, la resistenza e la voglia di lavorare durante l'esercizio.

Spesso la sintomatologia si rende evidente solo a velocità sostenute e può avere, come detto, un'eziologia multifattoriale. Per questo motivo un esame approfondito dell'apparato locomotore, comprensivo di una valutazione durante il normale allenamento o, possibilmente, durante la competizione, è solitamente il primo passo per l'identificazione di un calo delle performances. L'aggiunta della videoendoscopia ad alta velocità, l'elettrocardiografia in telemetria e l'ecocardiografia sotto stress, infine, forniscono notevoli informazioni quando ci vengono sottoposti casi di scarso rendimento. I disordini muscolari nel cavallo si presentano, quindi, con una varietà di segni clinici che vanno dalla rigidità e dolore muscolare,

all'atrofia, alla debolezza, ad intolleranza all'esercizio e fascicolazioni. La presentazione clinica più comune è caratterizzata da dolore muscolare, rigidità e riluttanza al movimento dovuti alla raddomiolisi. La raddomiolisi può riconoscere cause associate all'esercizio fisico (raddomiolisi da sforzo, Exertional rhabdomyolysis (ER)) e cause non correlate ad esso. Le cause di raddomiolisi non associata all'esercizio fisico possono essere di tipo infettivo (es. *Clostridium sp*, *Influenzavirus*, *Streptococcus equi*, *Sarcocystis*) e miopatie immuno-mediate, miodegenerazione nutrizionale (carezza di vitamina E o selenio), miopatia traumatica o da compressione, miopatia da pascolo idiopatica e danno tossico muscolare da ingestione di ionofori (es. monensin, lasalocid, rumensin). Dovrebbe anche essere presa in considerazione l'ingestione di alcune piante, comprese l'Ageratina altissima (nord America e nord Italia). Le cause genetiche della raddomiolisi non funzionale includono la deficienza di enzimi ramificanti il glicogeno (puledri), l'ipertermia maligna (Quarter horse) e la miopatia da accumulo di polisaccaridi.

Se risulta semplice per un professionista riconoscere i segni di raddomiolisi acuta nonché confermare la diagnosi mediante valutazione delle attività sieriche di creatina chinasi (CK) e aspartato aminotransferasi (AST), è sicuramente meno agevole identificare la causa di ridotte performances associate a dolore lieve e debolezza muscolare in quanto l'attività degli enzimi sierici muscolari risulta normale. L'esperienza, la selezione di strumenti diagnostici ed il relazionarsi col cavaliere/driver sono spesso necessari per determinare: l'impatto che la debolezza muscolare ha sulle prestazioni e sull'andatura; come influiscono il dolore muscolare, il comportamento, l'ambiente o il cavaliere sulla diminuzione delle prestazioni; se il dolore muscolare è principalmente il risultato di un disturbo muscolare o se questo si verifica in seguito a una condizione ortopedica di base.

Recentemente è stata descritta una miopatia infiammatoria in corso di Piroplasmosi cronica che sembra riconoscere una patogenesi immuno-mediate. Il danno muscolare sarebbe conseguente allo sviluppo di autoanticorpi contro gli antigeni muscolari. Inoltre, in corso di Piroplasmosi cronica, uno stimolo sconosciuto potrebbe attivare una serie di vie infiammatorie con conseguente sovraespressione sarcolemmica di MHC I e II, che a loro volta attirerebbe i linfociti T, i quali esacerbano e perpetuano la miopatia infiammatoria. Come accade in altre miopatie immuno-mediate, le infezioni croniche non causano danni muscolari attraverso una replica diretta dell'agente nel muscolo, ma innescano invece una risposta

infiammatoria persistente con cellule T attivate. Infatti, negli esseri umani e nelle scimmie infette da virus dell'immunodeficienza umana (HIV) che sviluppano polimiosite (PM) o miosite sporadica da corpi inclusi (sIBM), studi mediante PCR hanno ripetutamente fallito nel tentativo di confermare la presenza del virus all'interno del muscolo. Lo studio è stato condotto principalmente su soggetti insistenti sul territorio campano di razza Trottatore Italiano. La Campania, come tutta la penisola italiana, è una regione in cui la Piroplasmosi Equina risulta essere endemica.

Il ritrovamento di una miopatia infiammatoria immunomediata in associazione all'infezione cronica da Piroplasmi è stato il punto di partenza che ci ha spinti ad indagare sulla correlazione tra Piroplasmosi e calo delle performances atletiche.

Capitolo 1

Patologie muscoloscheletriche nella sindrome da scarso
rendimento del cavallo sportivo

1.1 La sindrome da scarso rendimento

I cavalli sono atleti capaci di notevoli performances in qualsiasi disciplina essi vengano impiegati. La prestazione è il risultato di un complesso equilibrio fisiologico, una preparazione atletica adeguata e fattori esterni al cavallo quali l'intervento di un cavaliere o la volontà del cavallo stesso di spingersi oltre i propri limiti. Se si considera esclusivamente il lato puramente fisico della prestazione, l'eccezionale capacità atletica di questa specie è correlata alla loro capacità aerobica massima, ai loro consistenti depositi intramuscolari di substrati energetici, in particolare glicogeno (140 mmol per kg di muscolo contro le 80-100 mmol/kg nell'uomo), alla loro attitudine ad aumentare il trasporto di ossigeno attraverso la contrazione splenica (che rilascia il 50% del totale dei globuli rossi) e l'aumento notevole dell'output cardiaco durante l'esercizio (Lindner, 2008).

L'importanza della via aerobica nell'apporto di energia ai muscoli, qualsiasi sia la disciplina, è ben riconosciuta nei cavalli. I cavalli da corsa, però, sono limitati principalmente dall'apporto di ossigeno a livello muscolare. Infatti, nonostante l'ampia area di scambio polmonare, l'aumento notevole della ventilazione, dell'output cardiaco e dell'ematocrito, quando superano il 60% della VO_2 max (massima potenza aerobica = massimo volume di ossigeno) diventano ipossiemicici ed ipercapnoici (Bayly et al., 1983).

Queste osservazioni suggeriscono che l'apparato respiratorio sia il fattore limitante riguardo l'esercizio ad alta intensità nella specie equina.

È bene effettuare una distinzione tra scarso rendimento e intolleranza all'esercizio. Se l'intolleranza è caratterizzata da cambiamenti recenti ed evidenti della prestazione durante la competizione o l'allenamento, ed è spesso correlata al verificarsi di un problema chiaro e specifico, lo scarso rendimento è inteso come performance al di sotto delle aspettative che possono essere dovute a differenti ragioni di più difficile evidenziazione (Lindner, 2008).

In letteratura sono due i principali lavori riguardanti le cause di scarse performance (Martin et al., 2000; Morris e Seeherman, 1991). Da entrambi emerge come la causa più frequente di calo di prestazioni (73,5%) sia rappresentata da un'ostruzione dinamica delle vie aeree superiori (soprattutto dislocazione del palato molle, collasso faringeo ed emiplegia laringea idiopatica) anche se nessuno dei due studi prevedeva l'esame delle basse vie respiratorie mediante lavaggio tracheo-bronchiale o bronco-alveolare. Ciò

potrebbe spiegare perché, nello studio di Martin et al. del 2000, per il 26,5% dei cavalli non si sia arrivati ad una diagnosi attendibile.

1.2 Patologie osteocondrali e sindrome da scarso rendimento

Tra le patologie che possono rendersi responsabili di scarso rendimento sono da annoverare quelle legate all'accrescimento. L'OCD (osteocondrosi disecante) è una patologia che si riscontra frequentemente nei giovani soggetti sportivi. In uno studio condotto da Couroucé-Malblanc et al. nel 2006 su 865 cavalli trottatori francesi, le articolazioni maggiormente interessate sono rappresentate dai nodelli sia anteriori che posteriori e dai tarsi. Questi risultati possono fornire un'indicazione riguardo le sedi su cui effettuare uno screening radiografico nel cavallo trottatore. In particolare si è visto che le lesioni ortopediche dell'accrescimento (numero, gravità e localizzazione) si ripercuotono sulle performances diminuendo la lunghezza della carriera agonistica. Nei trottatori, i frammenti dell'articolazione metatarso-falangea a localizzazione plantare influiscono significativamente sulle performances in gara tanto da dover essere considerate con cura nella previsione della carriera del soggetto (Couroucé-Malblanc et al., 2006).

La prevalenza di reperti radiografici anormali nei giovani trottatori francesi inclusi nello studio di Couroucé-Malblanc et al. si attestava sul 42,0% per i cavalli con almeno un frammento. I risultati mostrano una prevalenza leggermente al di sotto dei valori ottenuti in altri due lavori, uno danese (Strogaard Jorgensen et al., 1997) e l'altro canadese (Alvarado et al., 1989) in cui il 72,6% dei cavalli presentava alterazioni radiografiche. Inoltre, in uno studio su 129 trottatori francesi, Jacquet et al. (2003) hanno riscontrato una prevalenza di queste anomalie nel 65,0% dei soggetti. La prevalenza ottenuta da Couroucé-Malblanc è simile a quella del 42,2% ottenuta da Grondhal ed Engeland (1995) su una popolazione di 753 yearling dalla Norvegia nonché ai risultati di Alvarado et al. (1989) e Tourtoulou et al. (1997) che hanno riscontrato, rispettivamente, una percentuale del 31,5% su 73 trottatori e il 38% su 58 trottatori di età inferiore ad un anno. Per quanto riguarda la localizzazione della lesione, la prevalenza sul nodello plantare (17,9%) riscontrata da Couroucé-Malblanc è maggiore rispetto a quella dei trottatori yearling del Nord Europa o del Nord America (Alvarado et al., 1989; Grondhal 1992; Strogaard Jorgensen et al., 1997). Grondhal (1992) ha riscontrato una prevalenza dell'1,8% di lesioni radiograficamente evidenziabili nei nodelli sia anteriori che posteriori con il 94% di queste agli arti posteriori, simile a quella riscontrata da Jacquet et al. (2003) su una

popolazione di 129 trottatori francesi (19,2%) radiografati all'età di 1-2 anni. È interessante notare che gli autori che hanno radiografato soggetti di un anno, hanno trovato meno alterazioni della porzione plantare del nodello (Grondhal, 1992; Storgaard Jorgensen et al., 1997). Questo può essere spiegato dall'ipotesi di Dalin et al. (1993) che suggeriscono un'origine biomeccanica della frammentazione plantare, indotta da traumi ripetuti causati dall'allenamento e dalla tensione sui legamenti sesamoidei distali.

La prevalenza di lesioni a carico della regione tarsale prossimale è simile in tutti gli studi sui trottatori: 10,6% per Couroucé-Malblanc, 12% per Schougaard et al. (1990), 10,4% per Sandgren et al. (1993), 10,5% per Carlsten et al. (1993) e 12,4% per Brehm e Staecker (1999).

Per una corretta valutazione delle performances atletiche nel cavallo trottatore si devono considerare diverse variabili: vittorie, numero di partenze, numero di vittorie, numero di piazzamenti e record (Hoppe 1984; Alvarado et al. 1989; Hardy et al. 1991; Laws et al. 1993; Beard et al. 1994; Grondhal et al. 1994; Grondhal and Engeland 1995; Storgaard Jorgensen et al. 1997; Brehm and Staecker 1999; Torre, 1999). La valutazione di una sola variabile può essere responsabile di un bias. Ad esempio, il totale delle vittorie può variare in base all'attitudine fisica del cavallo e alle scelte di trainer e proprietario.

Per Beard et al. (1994), il numero di partenze può essere un buon indicatore per valutare la longevità della carriera, ma anche questa variabile può essere influenzata dal trainer che potrebbe far correre un cattivo performer con maggior frequenza per farlo migliorare.

Se si considera l'aspetto plantare dell'articolazione metatarso-falangea, c'era una differenza significativa negli indici di performance tra i cavalli con lesioni bilaterali con questa localizzazione e quelli che avevano un altro tipo di lesione o nessuna lesione. Inoltre, anche se la differenza non è risultata significativa, i cavalli con lesioni bilaterali avevano vinto somme inferiori all'età di 5 anni (Beard et al., 1994).

Barclay et al. (1987) hanno dimostrato che le zoppie dei posteriori causate da questi frammenti sono solitamente lievi, ma influiscono significativamente sulla prestazione atletica. Infatti, anche se probabilmente non è il frammento di per sé a causare dolore, si potrebbe verificare un danno a carico dei tessuti molli circostanti particolarmente durante la massima

estensione articolare nelle andature ad alta velocità. In alternativa, il frammento osteocondrale potrebbe modificare il normale scivolamento tra la superficie articolare metatarso-falangea e i sesamoidi in corso di esercizio intenso che determina uno stiramento dei tessuti molli articolari rendendosi responsabile del dolore.

I frammenti osteocondrali dell'aspetto palmare/plantare dell'articolazione metacarpo/metatarso-falangea non causano alterazioni cliniche significative in cavalli fino ai 2-3 anni di età. Comunque, poiché la carriera agonistica prevede il passaggio a categorie superiori ed un potenziale incremento delle vincite tra i 4 e i 6 anni di età, molti proprietari ed allenatori preferiscono che i frammenti vengano rimossi prima dell'inizio dell'allenamento (Houttu, 1991).

Non ci sono differenze sulle performance tra i cavalli che hanno o meno frammenti, sia essi monolaterali che bilaterali quando la localizzazione è a livello delle articolazioni prossimali del garretto (Courouc -Malblanc et al., 2006; Brehm and Staecker, 1999). Brehm and Staecker (1999) hanno esaminato radiograficamente l'articolazione tarso-crutale di 1190 trottatori. Comparando le performance atletiche dei cavalli affetti da OCD, ma non trattati chirurgicamente e cavalli non affetti da questa condizione, non c'erano differenze significative nel numero di partenze, numero di vittorie, numero di piazzamenti, somme vinte e velocit  massima. Analoghi risultati sono stati ottenuti da Storgaard-Jorgensen et al. (1997) per cavalli di 2, 3 e 4 anni. Grondahl and Engeland (1995), hanno studiato una popolazione di 753 trottatori di un anno (yearlings) in Norvegia. Nella successiva carriera agonistica, i cavalli affetti da OCD hanno fatto registrare un numero inferiore di partenze ma non di somme vinte rispetto ai cavalli sani. In questo studio, tuttavia, un alto numero di soggetti che mostravano alterazioni radiografiche evidenti all'et  di 1 anno erano stati sottoposti precocemente ad intervento chirurgico e per questo motivo non presentavano lesioni quando venivano messi in allenamento. Anche se non ci sono differenze significative nei diversi studi riguardo la correlazione tra lesioni osteocondrosiche delle articolazioni prossimali del garretto e performance atletiche, la rimozione preventiva dei frammenti risulta comunque indicata, per la sicurezza dell'intervento artroscopico a fronte del rischio di insorgenza di problemi ortopedici con il progredire della carriera, che potrebbero comportare maggiori costi ed una prognosi peggiore rispetto alla chirurgia precoce (Grondahl and Engeland 1995). L'effusione attribuibile

alla presenza di frammenti osteocondrali nell'articolazione tarso-crutale può essere considerata un'indicazione per l'intervento chirurgico in quanto la distensione articolare e la sinovite possono limitare le performance per un deficit dell'andatura conseguente alla diminuzione del ROM (range of motion) articolare (Laws et al. 1993). Comunque, in uno studio su 116 trottatori, solo un terzo dei soggetti con osteocondrosi mostravano zoppia accompagnata da effusione articolare tarso-crutale (Laws et al. 1993).

La conoscenza dell'evoluzione e del significato clinico delle diverse lesioni è di grande importanza per promuovere tra gli allenatori ed i proprietari l'importanza di uno screening radiografico precoce, allo scopo di intervenire precocemente nel trattamento dell'OCD. Sembra che il momento dell'intervento, in base all'età del cavallo, sia importante anche perché sia cavalli troppo giovani che cavalli vecchi non sono dei buoni candidati per la chirurgia. Il periodo migliore nei trottatori per l'intervento chirurgico è compreso tra i 18 e i 24 mesi (Geffroy 2005).

1.3 Lesioni traumatiche e sindrome da scarso rendimento

Sono pochi in letteratura i lavori riguardanti lo scarso rendimento correlato alla presenza di lesioni traumatiche nei cavalli da corsa. Si crede che questo tipo di lesioni abbiano origine da un certo grado di incordinazione (Leleu et al., 2004; Vilar et al., 2008) o da affaticamento muscolare (Couroucé-Malblanc e Hinchcliff, 2014). Sia in allenamento che in gara i cavalli trottoni vengono equipaggiati con una varietà di protezioni al fine di prevenire le lesioni dovute a possibili interferenze. Le protezioni dedicate agli arti anteriori si limitano a salvaguardare i glomi e la porzione mediale del carpo lasciando scoperta la faccia palmare del metacarpo e del nodello. Per lesioni da interferenza si indicano lacerazioni cutanee autoinflitte o tagli superficiali in regioni target degli arti anteriori (porzione mediale del carpo, regione metacarpale palmare, regione palmare del nodello e regioni palmari/mediali del pastorale) che si verificano durante le gare o in allenamento ad alta velocità che causano zoppia acuta ($\geq 3/5$ gradi della scala AAEP). Le contusioni che possono verificarsi alle alte velocità si traducono in tendiniti del flessore superficiale che influisce negativamente sulla carriera dell'animale (Bertuglia et al., 2014; Foland et al., 1991; O'Meara et al., 2010; Perkins et al., 2005).

Un recente studio retrospettivo condotto da Dabbene et al. (2018) ha indagato in un periodo di tempo compreso tra il 2008 ed il 2013. Dabbene et al. si sono proposti di descrivere i risultati clinici associati a lesioni causate da interferenza sulla porzione palmare degli arti anteriori e di delineare il loro esito sulle successive performance in un gruppo di cavalli trottoni rispetto ad un gruppo di controllo. È stato inoltre incluso un gruppo di soggetti nei quali la causa di tendinite fosse il sovraffaticamento per compararne gli effetti sulla carriera.

Le lesioni riscontrate da Dabbene et al. (2018) sono state: lacerazioni cutanee, traumi al processo stiloideo mediale del radio, tendinite o lacerazione parziale del SDFT, lacerazione della guaina tendinea dei flessori del dito, lesione del legamento anulare e lacerazione del fascio vascolonervoso digitale.

La maggior parte delle lesioni da interferenza si verifica a livello di metacarpo (39%) e della regione della guaina flessoria (27%), seguite da nodello (15%), pastorale (14%) e regione mediale del carpo (5%). Questi risultati indicano che le lesioni sono dovute all'impatto della punta dello zoccolo posteriore che colpisce la porzione palmare dell'arto anteriore, più

che all'anteriore controlaterale (Dabbene et al., 2018). Ad alta velocità, la flessione articolare e l'altezza cui si portano gli zoccoli posteriori aumentano durante la fase di oscillazione dell'andatura (Clayton et al., 2002), il che può aumentare il rischio che i posteriori raggiungano la porzione palmare degli arti anteriori. Nonostante una velocità maggiore sia stata segnalata da Couroucé-Malblanc et al. (2014) come possibile fattore di rischio per il verificarsi di lesioni da interferenza nei cavalli trottatori da corsa, Dabbene et al. (2018) non hanno osservato un'associazione tra probabilità nel verificarsi di lesioni e velocità in corsa. La ferratura aumenta l'inerzia nella porzione distale dell'arto (Clayton et al., 1998) e l'altezza massima dell'arco che il piede compie durante la fase di oscillazione del passo (Willemen et al., 1997). L'alterazione nella meccanica dell'andatura indotta dalla ferratura potrebbe avere un ruolo preventivo nei cavalli trottatori per il verificarsi di questo tipo di lesioni (Dabbene et al., 2018).

Le tendiniti del SDFT a livello della regione palmare del metacarpo e della guaina digitale si associano a un maggior tempo in termini di ritorno all'attività agonistica rispetto alle lesioni da sovraffaticamento (Dabbene et al. 2018). Anche i reperti ecografici rivelano lesioni di dimensioni minori nelle tendiniti da interferenza e questo spiegherebbe come mai il tempo di recupero risulta minore. È da sottolineare però che le ecografie effettuate in corso di tendiniti secondarie a lesioni da interferenza vengono effettuate con giorni di ritardo in caso lesioni cutanee associate e dunque è possibile che ci sia già una modificazione nell'ecogenicità e nell'estensione longitudinale delle lesioni (David et al., 2012).

Dai lavori citati si evince come queste lesioni possono influenzare negativamente le performances in termini di partenze in carriera, ma non sembrano influenzare la velocità in gara.

1.4 Miopatie e sindrome da scarso rendimento

I problemi muscolari, quando diagnosticati, si rendono responsabili di segni scarsamente specifici che limitano le prestazioni o la carriera del cavallo atleta (Lindner, 2008). Di questi, la rhabdomiolisi da sforzo (ER) è la più diffusa (Piercy e Rivero, 2004). Le stime indicano che circa il 5-7% dei cavalli da corsa possono essere colpiti (Cole et al., 2004; MacLeay et al., 1999; Upjohn et al., 2005) sia nei purosangue che nei trottatori. I trottatori con una storia di ER fanno registrare tempi in corsa migliori rispetto a quelli che non hanno mai mostrato sintomi di questa patologia, il che suggerisce possano esserci sia effetti benefici che deleteri della patologia sulle prestazioni atletiche (Isgren et al., 2010). Anche altre malattie neuromuscolari colpiscono i cavalli atleti, ma la loro incidenza è molto più bassa (Piercy e Rivero, 2004).

L'ER consiste in un processo degenerativo e rigenerativo della muscolatura scheletrica, generalmente indotto dall'esercizio. Di massima importanza è stata la consapevolezza maturata nel tempo che l'ER comprenda diverse miopatie che, nonostante le somiglianze nella presentazione clinica, differiscono notevolmente per quanto riguarda la fisiopatologia (Piercy e Rivero, 2004). Inoltre, il contributo di Valberg (2005) in relazione alla gestione dei cavalli con queste patologie, in particolare per quanto riguarda la dieta e l'esercizio fisico, ha significativamente ridotto la gravità della ER in molti cavalli.

I quadri clinici di ER sono molto variabili partendo da episodi subclinici fino ad arrivare a crisi miopatiche gravi e potenzialmente letali. Le forme subcliniche o paucisintomatiche possono essere di difficile identificazione, manifestandosi prevalentemente con scarse performance cui non si riesce a dare una spiegazione; in caso di crisi acute, la massiccia necrosi muscolare e la concomitante mioglobulinuria possono precedere l'insufficienza renale e, a volte, la morte. I segni clinici più comuni includono dolore muscolare alla palpazione profonda della regione lombare e/o dei glutei, tremori muscolari, rigidità e, occasionalmente, nei casi cronici, atrofia muscolare. Eccessiva sudorazione, tachipnea e tachicardia sono comuni nei casi acuti moderati e gravi. Nonostante la rhabdomiolisi inizi già dopo 15-30 minuti di lavoro alla velocità di 5 m/s, i segni clinici risultano evidenti solo dopo l'esercizio (Valberg et al., 1993). La diagnosi clinica di sospetto di ER si basa su una valutazione approfondita dell'anamnesi e dell'esame clinico, in combinazione con l'aumento delle attività plasmatiche di creatina chinasi

(CK) e aspartato transferasi (AST) e mioglobina (Valberg et al., 1993). La biopsia muscolare è utile per distinguere varie forme di ER e fornisce informazioni sulla patogenesi e sulla gravità di qualsiasi disturbo miopatico primario sottostante, consentendo quindi la valutazione della prognosi (Valberg et al., 1999).

Esistono due forme cliniche di ER, sporadiche (generalmente acquisite) e intermittenti (di solito ereditarie). I cavalli che sperimentano un singolo episodio o episodi infrequenti di necrosi muscolare indotta dall'esercizio fisico sono classificati come affetti da ER sporadica, mentre i cavalli che hanno episodi ripetuti di ER, anche dopo uno sforzo di lieve entità, sono classificati come affetti da ER ricorrente. È difficile documentare con certezza la causa della maggior parte delle forme sporadiche di ER, tuttavia sono stati proposti sovrallenamento e strappi muscolari, carenze dietetiche di elettroliti, vitamina E e selenio o esercizio eccessivo in associazione con infezione da herpes o influenza-virus. Le prove a sostegno di alcune di queste cause sono alquanto speculative o infondate (Dranchak et al., 2005; MacLeay et al., 1999).

Si ritiene che la ER intermittente sia spesso associata a miopatie ereditarie (genetiche) primarie. Ne sono descritte due forme specifiche: la miopatia da accumulo di polisaccaridi (PSSM) e la rabdomiolisi ricorrente (RER). Nel purosangue un'alterazione della regolazione del calcio intracellulare viene considerata la causa specifica di RER (Lentz et al., 1999).

La PSSM è stata descritta inizialmente in cavalli Quarter e cavalli con linee di sangue Quarter Horse (Valberg et al., 1992), ma un disturbo simile è stato riconosciuto in molte altre razze (Quiroz-Rothe et al., 2002; Valentine and Cooper, 2005; McCue et al., 2006). Si tratta di una malattia da accumulo di glicogeno caratterizzata dall'accumulo di glicogeno e complessi polisaccaridici anormali in una percentuale considerevole di fibre muscolari scheletriche. Il difetto metabolico comporta una regolazione anormale della sintesi del glicogeno piuttosto che un difetto nel suo utilizzo. Nel 2008 si è visto che una mutazione del gene H309G della glicogeno-sintetasi 1 (GYS1) risulta altamente associata alla presenza di polisaccaridi amilasi resistenti a livello dei muscoli scheletrici (McCue et al., 2008). Oggi si sa che esistono due forme di PSSM; una causata dalla mutazione genetica appena accennata e denominata di tipo 1 (PSSM1), mentre la forma o le forme di PSSM non causate dalla mutazione GYS1 e le cui origini sono ancora sconosciute sono definite di tipo 2 (PSSM2) (McCue et al., 2009). La PSSM1 è probabilmente lo stesso disturbo descritto come "Azoturia" o "malattia del lunedì mattina"

nei cavalli da lavoro nel diciannovesimo e nel ventesimo secolo.

- Alvarado, A., Marcoux, M. and Breton, L. (1989) The incidence of osteochondrosis in a Standardbred breeding farm in Quebec. *Proc. Am. Ass. equine Practns.* 35, 293-307.
- Barclay, W.P., Foerner, J.J. and Phillips, T.N. (1987) Lameness attributable to osteochondral fragmentation of the plantar aspect of the proximal phalanx in horses: 19 cases (1981-1985). *J. Am. Vet. Med. A.* 191, 855-857.
- Bayly, W. M., B. D. Grant, R. G. Breeze, and J. W. Kramer. The effects of maximal exercise on acid–base balance and arterial blood gas tensions in thoroughbred horses. In: *Equine Exercise Physiology*, edited by D. H. Snow, S. G. Persson, and R. J. Rose. Cambridge: Granta Editions, 1983, p. 400–404.
- Beard, W.L., Bramlage, L.R., Schneider, R.K. and Embertson, R.M. (1994) Postoperative racing performance in Standardbreds and Thoroughbreds with osteochondrosis of the tarsocrural joint: 109 cases (1984-1990). *J. Am. vet. med. Am.* 204, 1655-1659.
- Bertuglia, A., Bullone, M., Rossotto, F. and Gasparini, M. (2014) Epidemiology of musculoskeletal injuries in a population of harness Standardbred racehorses in training. *BMC Vet. Res.* 10, 11.
- Brehm, W. and Staecker, W. (1999) Osteochondrosis in the tarsocrural Joint of Standardbred trotters: correlation between radiographic findings and racing performance. *Proc. Am. Ass. equine Practns.* 45, 164-166.
- Carlsten, J., Sandgreen, B. and Dalin, G. (1993) Development of osteochondrosis in the tarsocrural joints and osteochondral fragments in the fetlock joint in Standardbred trotters. I. A radiological survey. *Equine vet. J. Suppl.* 16, 42-47.
- Clayton, H.M., Hoyt, D.F., Wickler, S.J., Cogger, E.A. and Lanovaz, J.L. (2002) Hindlimb net joint energies during swing phase as a function of trotting velocity. *Equine Vet. J.* 34, Suppl. 34, 235-239.
- Clayton, H.M., Lanovaz, J.L., Schamhardt, H.C., Willemen, M.A. and Colborne, G.L. (1998) Net joint moments and powers in the equine forelimb in the stance phase of the trot. *Equine Vet. J.* 30, 384-389.
- Cole, F.L., D.J. Mellor, D.R. Hodgson and S.W. Reid, 2004. Prevalence and demographic characteristics of exertional rhabdomyolysis in horses in Australia. *Vet Rec* 155: 625-630.
- Couroucé-Malblanc, A. and Hinchcliff, K.W. (2014) Veterinary aspects of racing and training horses used for harness racing. In: *Equine Sport Medicine & Surgery*, 2nd edn., Eds: K.W. Hinchcliff, A.J. Kaneps and R.J. Geor, Elsevier, Edinburgh, pp 1037-1055.

- Couroucé-Malblanc, A., Leleu, C., Bouxhilloux, M. and Geffroy, O. (2006) Abnormal radiographic findings in 865 French Standardbred trotters and their relationship to racing performance. *Equine Vet. J.* 38, Suppl. 36, 417-422.
- Dabbene, I., Bullone, M., Pagliara, E., Gasparini, M., Riccio, B. and Bertuglia, A. (2018), Clinical findings and prognosis of interference injuries to the palmar aspect of the forelimbs in Standardbred racehorses: A study on 74 cases. *Equine Vet J*, 50: 759-765. doi:10.1111/evj.12836
- Dalin, G., Sandgreen, B. and Carlsten, J. (1993) Plantar osteochondral fragments in the metatarsophalangeal joints in Standardbred trotters; results of osteochondrosis or trauma? *Equine vet. J.*, Suppl. 16, 62-65.
- David, F., Cadby, J., Bosch, G., Brama, P., van Weeren, R. and van Schie, H. (2012) Short-term cast immobilisation is effective in reducing lesion propagation in a surgical model of equine superficial digital flexor tendon injury. *Equine Vet. J.* 44, 570-575.
- Dranchak PK, Valberg SJ, Onan GW, et al. Inheritance of recurrent exertional rhabdomyolysis in thoroughbreds. *J Am Vet Med Assoc* 2005;227:762-7.
- Foland, J.W., Trotter, G.W., Stashak, T.S., McIlwraith, C.W., Turner, A.S. and Aanes, W.A. (1991) Traumatic injuries involving tendons of the distal limbs in horses: a retrospective study of 55 cases. *Equine Vet. J.* 23, 422-425.
- Geffroy, O. (2005) L'ostéochondrose: critères décisionnels pour aller en chirurgie. In: *Proceedings du Congrès de l'Association des Vétérinaires Praticiens Équins Français (AVEF)*. pp 224-226.
- Grondhal, A.M. and Engeland, A. (1995) Influence of radiographically detectable orthopedic changes on racing performance in Standardbred trotters. *J. Am. vet. med. Ass.* 206. 1013-1017.
- Grondhal, A.M. (1992) The incidence of bony fragments and osteochondrosis in the metacarpo-ans metatarsophalangeal joints of standardbred trotters. *J. equine vet. sci.* 12.81-85.
- Grondhal, A.M. and Engeland, A. (1995) Influence of radiographically detectable orthopedic changes on racing performance in Standardbred trotters. *J. Am. vet. med. Ass.* 206. 1013-1017.
- Grondhal, A.M., Gaustad, G. and Engeland, A. (1994) Progression and association with lameness and racing performance of radiographic changes in the proximal sesamoid bones of young Standardbred trotters. *Equine vet. J.* 26. 152-155.
- Hardy, I., Marcoux, M. and Breton, L. (1991) Clinical relevance of

- radiographic findings in proximal sesamoids boner of two-year-old Standardbreds in their first year of race training. *J. Am. med. vet. Ass.* 198, 2089-2094.
- Hoppe, F. (1984) Radiological investigations of osteochondrosis dissecans in Standardbred trotters and Swedish Warmblood horses. *Equine vet. J.* 16,425-429.
- Houttu I. (1991) Arthroscopic removal of osteochondral fragments of the palmar/plantar aspect of the metacarpometatarsophalangeal joints. *Equine vet. J.* 23, 163.165.
- Isgren CM, Upjohn MM, Fernandez-Fuente M, et al. Epidemiology of exertional rhabdomyolysis susceptibility in standardbred horses reveals associated risk factors and underlying enhanced performance. *PLoS One* 2010;5:e11594.
- Jacquet, S., Robert, C., Courtin, G., Valette, J.P., Coudry, V. and Denoix, J.M. (2003) Correlations entre le statut osteo-articulaire et les performances sportives de 129 Trotteurs Français de Basse Normandie. In: *Proceedings de lu ZWme JuurnPe d'Etude, Les Hums Nutionuux.* pp 83-92.
- Laws, E.G., Richardson, D.W., Ross, M.W. and Moyer, W. (1993) Racing performance of Standardbreds after conservative and surgical treatment for tarsocrural osteochondrosis. *Equine vet. J.* 25, 199-202.
- Leleu, C., Cotrel, C. and Barrey, E. (2004) Effect of age on locomotion of Standardbred trotters in training. *Equine Comp. Exerc. Physiol.* 1, 107-117.
- Lentz, L.R., S.J. Valberg, L. Herold, G.W. Onan, J.R. Mickelson and E.M. Gallant, 2002. Myoplasmic calcium regulation in myotubes from horses with recurrent exertional rhabdomyolysis. *AmJ Vet Res* 63: 1724-1731.
- Lindner, A. (Ed.) *The acute poorly performing sport horse.* Conference on Equine Sports Medicine and Science, Wageningen Academic Publishers. 165-171.
- MacLeay JM, Valberg SJ, Sorum SA, et al. Heritability of recurrent exertional rhabdomyolysis in thoroughbred racehorses. *Am J Vet Res* 1999;60:250–6.
- MacLeay, J.M., S.A. Sorum, S.J. Valberg, W.E. Marsh and M.D. Sorum, 1999. Epidemiologic analysis of factors influencing exertional rhabdomyolysis in Thoroughbreds. *Am J Vet Res* 60: 1562-1566.
- Martin, B.B. Jr, Reef, V.B., Parente, E.J. and Sage, A.D. (2000) Causes of poor performance of horses during training, racing, or showing: 348 cases (1992 –1996). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 216, 554-558.

- McCue ME, Armien AG, Lucio M, et al. Comparative skeletal muscle histopathologic and ultrastructural features in two forms of polysaccharide storage myopathy in horses. *Vet Pathol* 2009;46:1281–91.
- McCue, M.E., W.P. Ribeiro and S.J. Valberg, 2006. Prevalence of polysaccharide storage myopathy in horses with neuromuscular disorders. *Equine Vet. J. Suppl* 36: 340-344.
- McCue ME, Valberg SJ, Miller MB, et al. Glycogen synthase (GYS1) mutation causes a novel skeletal muscle glycogenosis. *Genomics* 2008;91:458–66.
- Morris, E.A. and Seeherman, H.J. (1991) Clinical evaluation of poor performance in the racehorse: the results of 275 evaluations. *Equine Vet. J.* 23, 169-174.
- O'Meara, B., Bladon, B., Parkin, T.D., Fraser, B. and Lischer, C.J. (2010) An investigation of the relationship between race performance and superficial digital flexor tendonitis in the Thoroughbred racehorse. *Equine Vet. J.* 42, 322-326.
- Perkins, N.R., Reid, S.W. and Morris, R.S. (2005) Risk factors for injury to the superficial digital flexor tendon and suspensory apparatus in Thoroughbred racehorses in New Zealand. *N. Z. Vet. J.* 53, 184-192.
- Piercy, R.J. and J.L.L. Rivero, 2004. Muscle disorders of equine athletes. In: K.W. Hinchcliff, A.J. Kaneps and R.J. Geor (Eds.) *Equine sports medicine and surgery*, Saunders Elsevier, Edingurgh, pp 77-110.
- Quiroz-Rothe, E., M. Novales, E. Aguilera-Tejero and J.L.L. Rivero, 2002. Polysaccharide storage myopathy in the M. longissimus lumborum of showjumpers and dressage horses with back pain. *Equine Vet. J.* 34: 171-176.
- Sandgren, B., Dalin, G. and Carlsten, J (1993) Osteochondrosis in tarsocrural joint and osteochondral fragments in the fetlock joints in Standardbred trotters. 1. Epidemiology. *Equine vet. J., Suppl.* 16. 31-37.
- Schougaard, H., Falk Ronne, I. and Philipson, I. (1990) A radiographic survey of tibiotalar osteochondrosis in a selected population of trotting horses in Denmark and its possible genetic significance. *Equine vet. J.* 22, 288-289.
- Storgaard Jorgensen, H., Proschowsky, H., Falk-Ronne, J., Willeberg. P. and Hesselholt, M. (1997) The significance of routine radiographic findings with respect to subsequent racing performance and longevity in standardbred trotters. *Equine vet. J.*, 29, 55-59.
- Torre, F. (1999) Osteochondrosis and poor performance: current knowledge

- and perspectives In: Proceedings 46 th WEVA World Congress. pp 143-146
- Tourtoulou, G., Caure, S., and Domaingue, M.C. (1997) La prevalence des lesions d'osteocondrose cher le poulain trotteur au sewage (Incidence of osteochondrosis in the trotter's weaning foals). *Prut. vet. Equine* 29. 237-244.
- Upjohn, M.M., R.M. Archer, R.M. Christley and C.M. McGowan, 2005. Incidence and risk factors associated with exertional rhabdomyolysis syndrome in National Hunt racehorses in Great Britain. *Vet Rec* 156: 763-766.
- Valberg, S.J., 2005. Differential diagnosis and nutritional management of equine exertional rhabdomyolysis. In: A Lindner (Ed.) *Applied equine nutrition*, Equine Nutrition Conference 2005, Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands, pp. 139-157.
- Valberg SJ, Cardinet III GH, Carlson GP, DiMauro S (1992). Polysaccharide storage myopathy associated with recurrent exertional rhabdomyolysis in horses. *Neuromuscular Disorders*. 2 (5-6): 351-359.
- Valberg S, Jonsson L, Lindholm A, et al. Muscle histopathology and plasma aspartate aminotransferase, creatine kinase and myoglobin changes with exercise in horses with recurrent exertional rhabdomyolysis. *Equine Vet J* 1993;25: 11-6.
- Valberg SJ, Mickelson JR, Gallant EM, et al. Exertional rhabdomyolysis in quarter horses and thoroughbreds: one syndrome, multiple aetiologies. *Equine Vet J Suppl* 1999;(30):533-8.
- Valentine, B.A. and B.J. Cooper, 2005. Incidence of polysaccharide storage myopathy: necropsy study of 225 horses. *Vet Pathol* 42: 823-827.
- Vilar, J.M., Spadari, A., Billi, V., Desini, V. and Santana, A. (2008) Biomechanics in young and adult Italian standardbred trotter horses in real racing conditions. *Vet. Res. Comm.* 32, 367-376.
- Willemsen, M.A., Savelberg, H.C.C.M. and Barneveld, A. (1997) The improvement of the gait quality of sound trotting warmblood horses by normal shoeing and its effect on the load on the lower forelimb. *Livestock Prod. Sci.* 52, 145-153.

Capitolo 2

I disordini muscoloscheletrici nel cavallo

Il sistema muscolo-scheletrico è deputato a supportare il corpo, consentirne il movimento e proteggere gli organi vitali.

I disturbi di questo apparato sono molto frequenti nel cavallo, sia per il suo impiego quale animale da soma o da lavoro, sia per l'utilizzo come soggetto sportivo per il quale, oltre alla performance in sé che può essere più o meno impegnativa, il gravare di un cavaliere in sella o sul sulky pone ulteriore stress su muscoli, ossa ed articolazioni. Qualsiasi problema a carico di queste strutture, organizzate in una complessa anatomia può portare a zoppia e prestazioni scadenti.

I disturbi dell'apparato muscolo-scheletrico influenzano molto spesso l'andatura e la gravità della compromissione è ovviamente correlata al tipo e all'entità del problema. Più comunemente si riscontrano disturbi, ma non bisogna trascurare il ruolo potenziale di affezioni muscolari, primitive o secondarie.

Sono innumerevoli le condizioni in cui l'intervento della componente muscolare gioca un ruolo fondamentale, non solo per l'attività motoria, ma anche nell'estrinsecarsi di funzioni che possono apparire scontate quali la respirazione o la masticazione e la deglutizione.

Le patologie muscolari possono essere suddivise in sei ampie categorie sulla base di una serie di caratteristiche clinico-patologiche distintive: atrofie, distrofie, miopatie infiammatorie, miopatie metaboliche, miopatie "congenite" e disturbi della trasmissione neuromuscolare. Nella pratica clinica i parametri utilizzati per la valutazione dello stato funzionale dei muscoli scheletrici sono l'anamnesi clinica e l'esame obiettivo del paziente, la valutazione degli enzimi muscolari sierici (che riflettono la distruzione delle fibre muscolari), l'elettromiografia e la biopsia muscolare. Il patologo deve considerare nell'insieme i dati clinici e di laboratorio ottenuti da tutti questi studi per una corretta valutazione della biopsia (De Girolami e Smith 1982).

Più in particolare i disturbi che colpiscono la membrana muscolare o le fibre muscolari prendono il nome di miopatie. Le affezioni della membrana muscolare possono riconoscere una causa ereditaria o essere acquisiti (De Girolami e Smith 1982). Le miopatie che coinvolgono le effettive componenti delle fibre muscolari nel cavallo sono in genere riconducibili alla cosiddetta miopatia da sforzo (Beech J. 1997). La diagnosi di un qualsiasi tipo di miopatia è comunque da confermare mediante i risultati ottenuti dai test di laboratorio.

Gli ultimi anni sono stati caratterizzati da enormi progressi nelle tecniche diagnostiche e terapeutiche dei disturbi muscoloscheletrici. Se rilevati

precocemente, questi disturbi possono spesso essere corretti, consentendo al cavallo un pieno ritorno ad una vita normale.

2.1 Cause muscolari di scarso rendimento

I disturbi muscolari rappresentano una comune causa di calo del rendimento nei cavalli. In passato si pensava che le diverse manifestazioni appartenessero ad un'unica sindrome clinica che veniva indicata con diversi nomi come tying up, malattia del lunedì mattina, azoturia, rabdomiolisi e mioglobinuria. Attualmente si ritiene che queste manifestazioni cliniche siano comuni a differenti disturbi muscolari con differenti eziologie e patogenesi (Valberg et al., 1999).

Lo scarso rendimento di origine muscolare riconosce come cause principali la debolezza muscolare ed il dolore (Fig. 2.1) e l'atrofia. La presentazione clinica più comune è caratterizzata da rigidità e riluttanza al movimento dovuti alla rabdomiolisi.

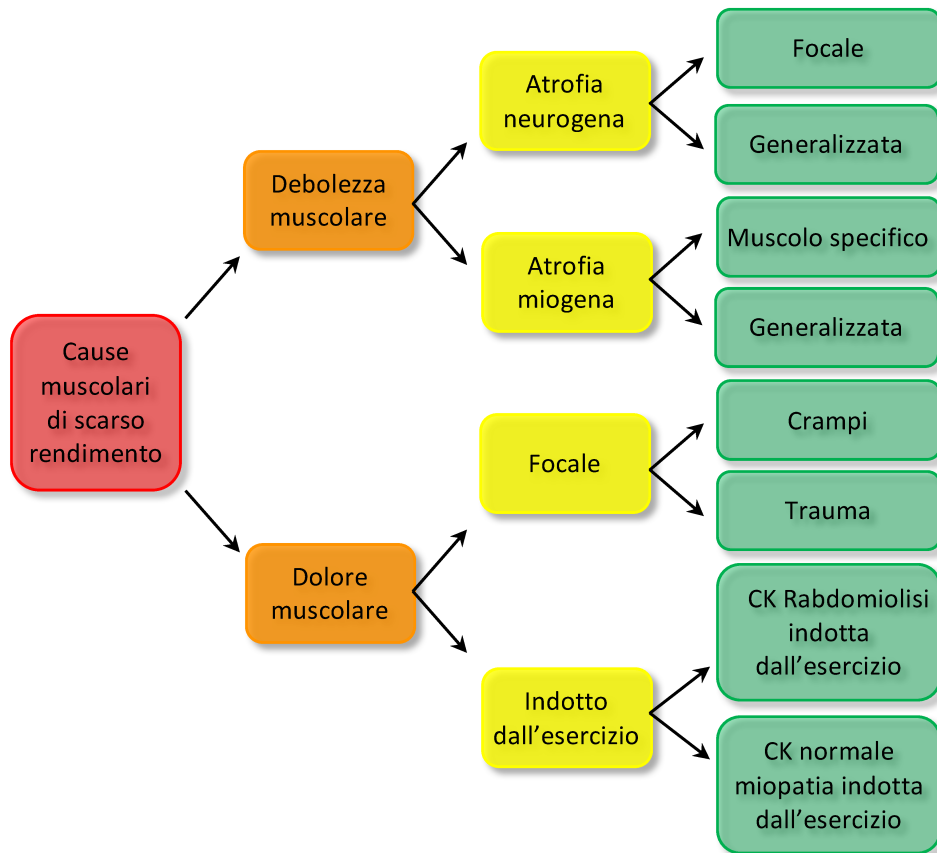


Fig. 2.1 Cause muscolari di scarso rendimento

Col termine rabdomiolisi si intende una distruzione delle cellule dei muscoli scheletrici. Una marcata riduzione della massa muscolare può essere facilmente riconosciuta anche dai proprietari, mentre modificazioni lievi e graduali, spesso passano inosservate. Seppur di minima entità, la perdita di massa muscolare si traduce inevitabilmente in riduzione della forza influenzando negativamente sulle prestazioni. Pertanto, è bene monitorare costantemente la massa muscolare dei cavalli sportivi e studiare le cause dell'eventuale perdita muscolare, quando questa è in fase iniziale e può essere controllata efficacemente col trattamento (Valberg S.J. 1996). La diagnosi di miopatia nel cavallo si basa su un' anamnesi approfondita, una accurata visita clinica, un esame emocromocitometrico completo e un profilo biochimico. Questo ci permette di determinare se la sintomatologia è propria del muscolo o secondaria ad altri processi patologici (Valberg S.J. 2006).

Nel cavallo alcuni disturbi muscolari mostrano caratteristiche cliniche, istopatologiche e, in certi casi, molecolari simili a quelle degli esseri umani, motivo per il quale il cavallo può essere considerato un modello animale per lo studio di malattie muscolari umane. Disturbi che colpiscono cavalli ed uomo includono la malattia del motoneurone inferiore del cavallo (Divers et al., 2006), che presenta analogie con la sclerosi laterale amiotrofica umana (Eisen, 2004); l'ipertermia maligna del Quarter Horse, dovuta ad alterazioni nel canale di rilascio del calcio a livello di reticolo sarcoplasmatico (Aleman et al., 2004). Altri disturbi possono comprendere la paralisi periodica ipercaliemica del Quarter Horse, causata da una mutazione del gene che codifica per la subunità α del canale del sodio del muscolo scheletrico (Rudolph et al., 1992) ed il deficit enzimatico dell'enzima ramificante il glicogeno sempre nel Quarter Horse ma anche nei puledri Paint, causata da modificazioni dell'enzima stesso (Ward et al., 2004).

Sono facilmente riconoscibili e diagnosticabili i segni di rabdomiolisi acuta che possono essere confermati dalla valutazione delle attività sieriche di creatina chinasi (CK) e aspartato transaminasi (AST). Meno agevole è la diagnosi di scarse performances quando a causarle sono dolore lieve e debolezza muscolare accompagnate da valori dell'attività degli enzimi sierici muscolari normali (Valberg S.J. et al. 1993).

La maggiore diffusione delle conoscenze su queste patologie e la disponibilità di iter diagnostici specifici che includano l'impiego di tecniche istologiche, biochimiche e molecolari consentiranno nel tempo il riconoscimento di uno spettro di miopatie del cavallo sempre più ampio. Le cause note di miopatie equine sono elencate nella tabella 2.1.

I. MIOPATIE NON DA SFORZO	II. MIOPATIE DA SFORZO
<p>A. Con rhabdomiolisi</p> <p>Nutrizionali Deficienza di vitamina E e selenio</p> <p>Metaboliche Deficienza dell'enzima ramificante il glicogeno Miopatia da accumulo di polisaccaridi</p> <p>Associate ad anestesia Miopatia compartimentale Ipertermia maligna</p> <p>Tossiche Associate al pascolo Associate a farmaci/agenti chimici Tossicosi da ionofori Tossicosi da organofosforici</p> <p>Traumatiche</p> <p>Infiammatorie Infettive Virali, batteriche e parassitarie</p> <p>Immunomediate</p> <p>B. Senza rhabdomiolisi</p> <p>Miopatia da disfunzione della pars intermedia ipofisaria</p> <p>Indotta da steroidi Atrofia da disuso Atrofia muscolare associata a neoplasia Neoplasia (rara)</p>	<p>A. Con rhabdomiolisi</p> <p>Sporadiche Scarso allenamento Sovrallenamento Colpo di calore Squilibri elettrolitici</p> <p>Croniche Squilibri alimentari Miopatia da accumulo di polisaccaridi Rhabdomiolisi ricorrente da sforzo Idiopatica</p> <p>Traumatiche</p> <p>B. Senza rhabdomiolisi</p> <p>Miopatia mitocondriale Deficit del complesso I della catena respiratoria Miopatia da disfunzione della pars intermedia ipofisaria</p>
	<p>III. ALTERATA CONDUZIONE DI MEMBRANA</p> <p>Anomalie elettrolitiche Tetania (grave ipocalcemia) Altri</p> <p>Paralisi periodica ipercaliemica Distrofia miotonica Spasmi muscolari associati alla zecca dell'orecchio (<i>Otobius megnini</i>)</p>

Tab. 2.1 Cause di miopatia nel cavallo

Questa classificazione distingue le miopatie in due categorie: da sforzo e non, ulteriormente suddivise in base alla capacità o meno di determinare rhabdomiolisi. Un'ultima categoria riguarda, invece, le malattie associate ad alterazioni della conduzione a livello di membrana (Aleman 2008).

La perdita di massa muscolare può essere focale o generalizzata. La causa scatenante può essere un danno all'innervazione motoria del muscolo (atrofia neurogena) o un danno diretto delle fibre muscolari (atrofia miogena) (Fig. 2.2) (De Girolami e Smith 1982).

Tra le numerose cause di rhabdomiolisi non associata all'esercizio fisico tratteremo quelle di tipo infettivo (es. *Clostridium sp*, *influenza*, *Streptococcus equi*, *Sarcocystis*) e le miopatie immuno-mediate in cui rientra la miopatia riscontrata in corso di infezione da Piroplasmia recentemente descritta (Pasolini et al, 2018), che è stata di spunto per il presente lavoro di dottorato.

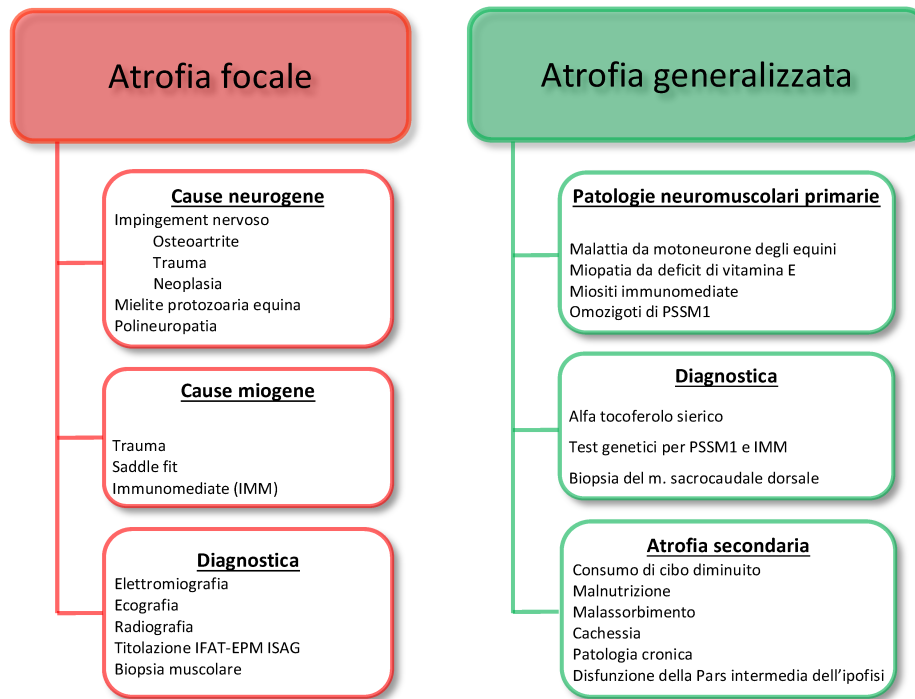


Fig. 2.2 Cause di atrofia muscolare focale e generalizzata e test diagnostici consigliati

2.2 Iter diagnostico in caso di sospetto di patologia muscolare

Il sospetto clinico di una patologia neuromuscolare deve innescare un iter diagnostico metodico ed accurato al fine di giungere ad una diagnosi esatta. È altresì importante escludere qualsiasi malattia che possa mimare una malattia muscolare o una malattia a carico dei nervi periferici (Platt e Garosi, 2004). Sarà utile considerare eventuali cambiamenti nell'appetito, nella dieta, nella somministrazione di integratori, nell'accesso a pascoli freschi, nella routine di allenamento, l'anamnesi vaccinale, l'esposizione a malattie infettive e precedenti casi di atrofia muscolare o di malattia sistemica. La perdita di massa muscolare è particolarmente significativa nei cavalli con un appetito normale ed in piena attività (Valberg 2006).

Alcune patologie neuromuscolari, inoltre, riconoscono preferenze di razza e sesso e molte di queste patologie congenite o ereditarie si manifestano subito dopo la nascita o nei primi mesi di vita dell'animale (Valberg 2006). In corso di esame obiettivo generale, risulta inoltre utile valutare la capacità di prensione, masticazione e deglutizione di acqua e cibo. Anche le vocalizzazioni possono essere alterate nelle patologie neuromuscolari, per danni a livello della muscolatura o dell'innervazione faringea e/o laringea.

Un'attenta ispezione del cavallo perfettamente in appiombò rivelerà una perdita simmetrica o asimmetrica della massa muscolare. Nei cavalli con debolezza muscolare la valutazione della postura è importante da osservare perché questi soggetti potrebbero portare gli arti sotto di sé o spostare alternativamente il peso da un posteriore all'altro. Le fascicolazioni possono anche indicare una significativa debolezza muscolare (Valberg 2006). La conoscenza della massa muscolare normale per quella razza a quel livello di forma fisica e della massa muscolare precedente dell'individuo prima dell'instaurarsi di scarse prestazioni è necessaria per determinare il significato delle osservazioni. L'ispezione è seguita da un esame clinico e neurologico completo; si dovrà prestare particolare attenzione alla palpazione dei muscoli per tono, atrofia e dolore, ad alterazioni dell'andatura e della propriocezione (Valberg 2006).

A completamento della visita clinica è indispensabile la valutazione di variazioni evidenziabili all'esame ematologico, biochimico e delle urine. Il dosaggio degli enzimi sierici quali creatinfosfochinasi (CK), aspartato transaminasi (AST) e lattico deidrogenasi (LDH) possono essere indicativi di patologia muscolare. Valori molto superiori ai limiti di riferimento si riscontrano in corso di distrofie muscolari o mionecrosi (Valberg et al. 1993).

È possibile effettuare anche studi di elettrodiagnostica che permettono di indagare in maniera più specifica il sistema neuromuscolare. Questi comprendono l'elettromiografia (EMG), la valutazione della velocità di conduzione nervosa motoria e sensitiva, la valutazione della funzionalità della placca neuromuscolare tramite il test di stimolazione ripetitiva sopramassimale e la valutazione della funzionalità delle radici nervose dorsali e ventrali attraverso i potenziali evocati somato sensitivi delle corna dorsali e le onde F (Cuddon, 2002).

I risultati degli esami elettrodiagnostici permettono una prima interpretazione dei segni clinici ed una diagnosi differenziale tra patologie assonali, patologie della mielina e patologie muscolari, nonché una valutazione della loro distribuzione e gravità (Platt e Garosi, 2004).

L'utilizzo dell'elettromiografia è, inoltre, estremamente utile per la scelta del sito da sottoporre a biopsia muscolare (Platt e Garosi, 2004).

2.2.1 Elettromiografia (EMG)

L'elettromiografia valuta la stabilità delle membrane delle fibre muscolari e negli animali si basa sulla registrazione dei potenziali di inserzione e dei potenziali spontanei delle fibre muscolari (Cuddon, 2002). Eseguendo un'EMG si può giungere ad una diagnosi specifica della causa di atrofia muscolare, di fascicolazioni muscolari o pseudomiopia (formazione di fossette miotoniche dopo aver percusso il muscolo) (Wijnberg et al. 2004; Wijnberg et al. 2003). L'esame elettromiografico di un muscolo scheletrico normale è caratterizzato da un breve scoppio (*burst*) di attività elettrica quando l'ago viene inserito nel muscolo seguito da quiescenza a meno che non vengano reclutate unità motorie (potenziali di azione dell'unità motoria), o l'ago si trova molto vicino a una placca motoria terminale (potenziali miniatura di membrana post-sinaptica). Un muscolo normale mostra una piccola attività elettrica spontanea a meno che non ci sia una contrazione del muscolo o un movimento del cavallo. I soggetti con anomalie nel sistema di conduzione elettrica del muscolo, o denervazione delle unità motorie, mostrano attività elettrica spontanea anomala sotto forma di potenziali di fibrillazione, onde acute positive, scariche miotoniche o scariche ripetitive complesse. Caratteristiche forme delle onde possono indicare disturbi specifici come atrofia della denervazione, HYPP (Paralisi periodica ipercaliemica) o miopia (Montagna et al., 2001; Naylor et al., 1992; Robinson et al., 1990; Reed et al., 1988; Steinberg and Botelho, 1962).

2.2.2 *Biopsia muscolare*

La biopsia muscolare è indicata se l'alterazione muscolare influisce sulle prestazioni o se non c'è risposta ai cambiamenti di dieta ed allenamento.

Un muscolo dovrebbe essere sottoposto a biopsia in caso di un forte sospetto di patologia muscolare clinicamente evidente e dopo che un'eventuale esame di zoppia abbia dato esiti negativi per altre lesioni.

La scelta del muscolo più appropriato per l'effettuazione della biopsia è di fondamentale importanza per ottenere le migliori informazioni diagnostiche. Lo scopo di questa procedura è quello di prelevare un muscolo colpito dal processo patologico in atto ma che non mostri marcata atrofia o sostituzione con tessuto connettivo fibroso, essendo questo già uno stadio terminale della malattia e che renderebbe l'esame scarsamente significativo ai fini diagnostici (Dickinson e LeCourter, 2002).

In caso di atrofia muscolare focale, i campioni muscolati dovrebbero essere prelevati dal muscolo atrofico. Se al contrario l'atrofia è generalizzata si preferisce campionare il sacrocaudale dorsale mediale (SC) in quanto questo muscolo è spesso l'unico a mostrare lesioni dovute a miopatia da carenza di vitamina E (VitEM) o malattia da motoneurone degli equini (EMND) (Divers et al., 1994).

In caso di rhabdomiolisi da sforzo, d'altro canto, sono spesso coinvolti i muscoli semimembranoso e gluteo medio: saranno dunque questi ad essere campionati, anche in funzione della facilità di raccolta utilizzando rispettivamente una tecnica aperta e ad ago (McCue et al., 2006; Ledwith and McGowan, 2004).

Il prelievo bioptico chirurgico con incisione di cute, sottocute e fascia muscolare è preferibile a quello mediante punch transcutaneo perché permette di ottenere un campione di dimensioni e orientamento adeguati (Dickinson et al., 2002). Deve essere infatti prelevato un campione cilindrico lungo circa 1,5 cm, e di larghezza e spessore pari ad 1 cm, in cui le fibre siano orientate longitudinalmente secondo la lunghezza del cilindro (Dickinson et al., 2002). La somministrazione di antibiotici o antinfiammatori non è necessaria. I cavalli sottoposti a biopsia muscolare possono tornare a normale lavoro in 2-3 giorni. Lavori impegnativi dovrebbero, invece, essere intrapresi quando la linea di sutura risulterà guarita o, in caso di deiscenza della sutura, quando è possibile evidenziare un tessuto di granulazione sano (Valentine et al., 2010). L'orientamento delle miofibre nel campione è fondamentale in quanto permette un corretto posizionamento nella fase di congelamento per ottenere sezioni trasversali

delle fibre, ottimali per la valutazione istomorfologica. La biopsia dovrebbe essere effettuata a livello del ventre muscolare, evitando le zone di inserzione tendinea e le aponeurosi dove le caratteristiche istologiche possono essere non rappresentative del tessuto muscolare da esaminare (Dickinson et al., 2002). Il cilindro di muscolo ottenuto deve essere avvolto in una garza inumidita con poche gocce di soluzione fisiologica e posto in una provetta chiusa per evitare la disidratazione (Dickinson et al., 2002). I campioni non devono essere immersi in soluzione fisiologica, né devono essere congelati ma inviati, refrigerati mediante un siberino, al laboratorio entro le 24-36 ore dal prelievo. Un secondo campione muscolare può essere inviato fissato in formalina. All'arrivo in laboratorio il campione fresco viene congelato per immersione in isopentano preraffreddato in azoto liquido e conservato a -80°C. Tramite criostato vengono eseguite sezioni seriate, colorate quindi con metodi istologici e istochimici di routine quali ematossilina-eosina e tricromica di Engel. Queste due colorazioni sono utili per la valutazione della forma e delle dimensioni delle miofibre, per la valutazione del tessuto connettivo endomisiale e perimisiale e per l'evidenziazione di cellule infiammatorie (Dickinson et al., 2002). Altre colorazioni utili possono essere la PAS, che consente di evidenziare i polisaccaridi intramiofibrili e l'Oil Red O che serve ad evidenziare i lipidi intramiofibrili. Per quanto riguarda i metodi istoenzimatici utilizzati per valutare il tessuto muscolare, l'ATPasi viene usata per la tipizzazione miofibrile mentre l'Esterasi si utilizza per valutare le esterasi non specifiche presenti nei lisosomi e nelle placche neuromuscolari. Ancora, metodiche utilizzate per la valutazione del pattern enzimatico ossidativo miofibrile sono: la succinicodeidrogenasi (SDH), che è un enzima puramente mitocondriale codificato dal DNA mitocondriale e nucleare; la nicotinamide adenindinucleotide-tetrazolioreduttasi (NADH-TR), che consente di valutare l'architettura interna della fibra muscolare ed è presente a livello mitocondriale e del reticolo sarcoplasmatico; la citocromossidasi (COX), anche questo un enzima puramente mitocondriale, prodotto esclusivamente dal DNA mitocondriale e per questo motivo utilizzabile per la diagnosi delle miopatie mitocondriali, che si caratterizzano per il danno al mDNA. (Joyce et al., 2012) L'esigenza di poter disporre di campioni freschi congelati è legata proprio alla necessità di eseguire specifiche colorazioni istoenzimatiche per la tipizzazione miofibrile e la localizzazione degli enzimi ossidativi, che non potrebbero essere eseguite su campioni fissati in formalina (Dickinson e LeCouteur, 2002). Parte del campione può essere fissato in glutaraldeide al 2,5%, quindi in tetrossido di

osmio ed infine incluso in resina di Spurr, per allestire sezioni ultrasottili per microscopia elettronica. Le indagini ultrastrutturali consentono di valutare la morfologia mitocondriale o miofibrillare, confermando quindi le valutazioni ottenute dalla valutazione istochimica ed istoenzimatica (Joyce et al., 2012). Indagini di immunoistochimica possono consentire la rivelazione di antigeni di *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Leishmania infantum* nel cane (Paciello et al., 2009) o la tipizzazione degli infiltrati infiammatori (Vattemi et al., 2014). L'immunoistochimica è un'indagine sensibile anche per la caratterizzazione delle distrofie tramite la valutazione della presenza di proteine quali la distrofina, i sarcoglicani, o altre proteine la cui mancanza è responsabile di miopatie di tipo distrofico ben descritte nell'uomo, e ancora scarsamente tipizzate negli animali domestici (Shelton, 2004). I risultati che si ottengono da queste indagini immunoistochimiche possono guidare eventuali indagini genetiche per il riconoscimento di specifiche mutazioni (Shelton, 2004).

2.3 Miopatie infiammatorie e parassitarie

Le miopatie infiammatorie più comuni negli esseri umani includono la dermatomiosite immunomediata, la polimiosite e la miosite a corpi inclusi (Briani et al., 2006). Nei cavalli le miopatie infiammatorie sono il risultato di cause immunomediate ed infettive. Sulla base delle manifestazioni cliniche e della valutazione immunostochimica si riconoscono tre tipi di miopatia immunomediata nel cavallo caratterizzate da rhabdomiolisi acuta grave, grave vasculite con infarto e rapida atrofia muscolare (Lewis et al., 2007; Sponseller et al., 2005; Kaese et al., 2005). Le cause infettive sono rappresentate da clostridi, streptococchi e parassiti (Kaese et al., 2005; Peek et al., 2003).

A dispetto di quanto precedentemente detto, se in campo umano la letteratura offre riferimenti bibliografici riguardo a miositi sostenute da diversi parassiti, in medicina veterinaria questi sono davvero scarsi nell'equino e si riferiscono essenzialmente a miositi da *Sarcocisti* e *Trichinella*.

2.3.1 Miositi parassitarie

2.3.1.1 *Sarcocisti*

I protozoi del genere *Sarcocystis* spp. sono parassiti che hanno un ciclo vitale comprendente due ospiti. La presenza di *Sarcocystis* spp. nel muscolo equino rappresenta la parte del ciclo biologico che interessa l'ospite intermedio. Il cavallo ingerisce le sporocisti con l'assunzione di foraggi contaminati da feci di carnivori e, a livello intestinale vengono rilasciati gli sporozoiti, che migrano verso vari siti. Gli schizonti di seconda o terza generazione si sviluppano a livello delle fibre muscolari all'interno di cisti a pareti sottili. L'ingresso nelle fibre muscolari può causare, in caso d'infestazione massiva, ampia degenerazione fibrale con rilascio significativo di enzimi. L'aumento di dimensioni delle cisti nel corso dei successivi 100 giorni può determinare ulteriore danno muscolare e zoppia. Nella specie equina sono state riconosciute quattro specie differenti di sarcocisti (*S. bertrami*, *S. equicanis*, *S. neurona* e *S. fayeri*), anche se ci sono controversie riguardo al fatto che esse appartengano realmente a specie differenti (Snow e Guy, 1976; Jeffcott, 1999).

In diversi studi si sono riscontrate un'elevata prevalenza post-mortem di sarcocisti nelle sezioni di muscolo (in particolare lingua ed esofago), la

presenza occasionale di sarcocisti in altre biopsie di muscoli scheletrici nonché prove di infezione transplacentare (McEwen e Hulland, 1986; Wrogemann e Pena, 1976), questo suggerisce che, probabilmente, siano comuni le infezioni asintomatiche.

Controversie si hanno anche riguardo a quanto grave debba essere l'infestazione per rendersi responsabile di disturbi muscolari clinicamente manifesti. Dodici di 91 cavalli con una storia di problemi muscolari cronici e sottoposti a biopsia muscolare sono risultati positivi per sarcocisti (Wrogemann e Pena, 1976). L'individuazione di questi soggetti non è stata però possibile basandosi sui soli dati di laboratorio, sull'anamnesi o sui segni clinici. In un cavallo con sarcocistosi diffusa sono stati riportati perdita di peso, letargia, difficoltà di masticazione e deglutizione, debolezza muscolare generalizzata e fascicolazioni, segni clinici attribuiti all'infestazione stessa (Oredsson et al., 1991). È stata inoltre segnalata la comparsa di malattia cronica in un pony infettato sperimentalmente (Hulland, 1985). Probabilmente è necessaria una massiva infestazione per provocare una malattia clinicamente evidenziabile (Charge e Rudnicki, 2004).

2.3.1.2 *Trichinella spiralis*

Larve incistate di *Trichinella spiralis* si possono rinvenire all'interno di un segmento rigonfio e vitreo della fibra muscolare in cavalli alimentati con mangimi contenenti tessuto muscolare suino contaminato. Si comprende, perciò, quanto la Trichinosi equina sia rara. È interessante notare che un sondaggio ha rilevato che in Serbia la somministrazione di rifiuti carnei ai cavalli era pratica relativamente comune e si pensa possa essere praticata anche in altri paesi europei. Questa osservazione ha condotto i ricercatori a concludere che in Europa la sorveglianza per *Trichinella* non dovrebbe essere sospesa (Grefte et al., 2007). Di solito è presente una cisti per fibra e la larva può misurare fino a 100 micron di lunghezza. Degenerazione (più rigenerazione) si può verificare nelle fibre muscolari vicine. La larva può vivere per molti anni ma, se il segmento parassitato degenera, la larva si ritrova esposta e muore in breve tempo, il che a sua volta si traduce in un'inflammatione acuta prevalentemente eosinofila (Snow e Guy, 1976; Westermann et al., 2007). L'infezione parassitaria sembra essere asintomatica ma può costituire un pericolo per la salute degli esseri umani nei paesi in cui è consueto il consumo di carne equina.

2.3.2 Miopatie infiammatorie e necrotizzanti del cavallo

Come precedentemente detto, le miopatie infiammatorie più comuni (IM) negli esseri umani comprendono la dermatomiosite immuno-mediata (DM), la polimiosite (PM), e la miosite da corpi inclusi (sIBM) (Briani et al., 2006). Nei cavalli, le IM riconoscono principalmente cause immunomediate o infettive.

Sulla base della presentazione clinica e della valutazione immunoistochimica, sono state caratterizzate tre distinte miopatie equine immunomediate:

- miopatia infiammatoria acuta grave, associata a rabdomiolisi;
- miopatia infiammatoria associata a vasculite e lesioni muscolari infartuali;
- miopatia infiammatoria associata a rapida atrofia muscolare (Lewiss et al., 2007; Sponseller et al., 2005; Kaese et al., 2005).

Le cause infettive includono principalmente clostridi, streptococchi e parassiti (Kaese et al., 2005; Peek et al., 2003) ma anche virus ed altri batteri.

2.3.2.1 Miosite da Clostridi

Nel cavallo, diverse specie di clostridi possono sporulare in un sito di iniezione intramuscolare o in una ferita profonda causando gonfiore muscolare focale e tossiemia sistemica (Perdrizet et al. 1987; Bruehaus et al., 1983; Rebhun et al. 1985; Valberg and McKinnon, 1984). Le infezioni da *Clostridium septicum*, *C. chauvoei*, *C. sporogenes* o infezioni miste sono associate ad un alto tasso di mortalità, mentre quelle da *C. perfringens* di tipo A ha un tasso di mortalità del 20% se un trattamento aggressivo viene iniziato tempestivamente. Le spore di clostridio possono rimanere dormienti nel tessuto muscolare o vi possono essere veicolate direttamente nel momento dell'iniezione. Se esistono condizioni necrotiche adeguate, le spore si convertono in forma vegetativa liberando potenti esotossine. Entro 48 ore, i cavalli mostrano depressione, febbre, tossiemia, tachipnea e diversi gradi di gonfiore e crepitio nel sito di iniezione. Tremori, atassia, dispnea, decubito, coma e morte possono verificarsi nelle successive 12-24 ore (Horner, 1982; Bruehaus et al., 1983). Alcuni soggetti possono andare incontro anche a danno miocardico. Gli esami ematobiochimici di solito riflettono uno stato generalizzato di debilitazione e tossiemia, con emocoagulazione e un leucogramma tossico/da stress. Il CK e l'AST sierici in genere si presentano moderatamente aumentati, ma spesso non

riflettono proporzionalmente la tossicità della necrosi muscolare.

La valutazione ecografica delle aree gonfie può rivelare un accumulo di fluido e caratteristiche zone iperecogene di gas. La valutazione citologica dei tessuti affetti dovrebbe mettere in evidenza i tipici batteri a forma di bastoncello. Anche la coltura batterica in anaerobiosi dei campioni appena acquisiti può essere utile (Valberg and McKinnon 1984; Rebhun et al. 1985; Perdrizet et al. 1987). Il drenaggio mediante incisione del tessuto interessato può permettere la fuoriuscita di abbondante liquido siero-ematico con un odore di burro rancido. Per una terapia di successo, è necessaria la fenestrazione chirurgica ed un curettage aggressivo su tutta l'area interessata. In contemporanea si dovranno somministrare alte dosi di penicillina per via endovenosa ogni 2-4 ore fino alla stabilizzazione della sintomatologia (da 1 a 5 giorni). A questa dovrà essere abbinata, in contemporanea o successivamente, la somministrazione di metronidazolo per via orale, terapia di supporto e farmaci antinfiammatori (Bruehaus et al. 1983; Valberg and McKinnon 1984; Rebhun et al. 1985). Si verifica molto frequentemente la perdita del rivestimento cutaneo sulla zona interessata.

2.3.2.2 Miopatia da *Streptococcus acuta grave associata a rhabdomiolisi*

La rhabdomiolisi acuta grave è una rara, ma spesso fatale, complicanza delle infezioni delle vie respiratorie superiori sostenute da *Streptococcus equi equi*, uno streptococco β -emolitico appartenente al gruppo C degli streptococchi.

I segni clinici più comuni includono mialgia, mioglobinuria, rigidità, andatura anomala, soprattutto a carico degli arti pelvici, gonfiore ed edema dei muscoli epiassiali e glutei, decubito (Sponseller et al., 2005). I segni clinici progrediscono rapidamente e possono portare alla morte, nonostante trattamenti aggressivi a base di antibiotici, antinfiammatori, fluidi, e terapia di supporto. La gravità e la rapida progressione della malattia in questi cavalli è simile alla sindrome da shock tossico da streptococco nell'uomo, caratterizzata da un'infezione tissutale profonda, batteriemia, sepsi, collasso vascolare, ed insufficienza multiorgano (Brown et al., 2004).

I cavalli affetti mostrano caratteristicamente leucocitosi con neutrofilia, e iperfibrinogenemia. I valori di CPK sono marcatamente elevati (> 100.000 UI/L). Istopatologicamente le alterazioni più frequenti sono rappresentate da grave mionecrosi (fino al 75% delle miofibre) ed infiltrazione istiocitaria (Sponseller et al., 2005). Si possono anche osservare linfociti dispersi (Sponseller et al., 2005).

Colorazioni speciali per i carboidrati specifici degli Streptococchi di gruppo C e antisieri specifici diretti contro le proteine M (SeM) di *S. equi* possono evidenziare numerosi corpi batterici cocchiformi nel muscolo scheletrico (Sponseller et al., 2005). Inoltre, i cavalli colpiti presentano elevati titoli anticorpali sierici diretti contro la proteina streptococcica legante la miosina (Sponseller et al., 2005).

La fisiopatologia della malattia non è ancora perfettamente chiara ma la presenza di superantigeni streptococcici potrebbe svolgere un ruolo importante nella patogenesi delle lesioni come descritto nell'uomo in corso di miopatia streptococcica necrotizzante (Alouf et al., 2003).

2.3.2.3 Miositi di origine virale

Alcune malattie virali quali l'influenza equina e l'anemia infettiva equina possono rendersi responsabili di necrosi dei muscoli scheletrici e del miocardio. Nella maggior parte delle situazioni, il danno muscolare indotto dal virus rappresenta solo parte del coinvolgimento sistemico in atto. È stato riscontrato che anche l'herpesvirus tipo 1 induce rigidità muscolare primaria e segni clinici che ricordano la raddomiolisi da sforzo (Hunyadi et al., 2017).

2.3.2.4 Miopatia da *Anaplasma*

I cavalli che vengono infettati da *Anaplasma phagocytophilum* tramite il morso di zecca, possono a volte sviluppare segni clinici di grave rigidità muscolare oltre a febbre, malessere ed edema degli arti. I reperti ematologici comprendono anemia, trombocitopenia, neutropenia, morula visibile all'interno dei granulociti e aumenti importanti dei livelli sierici di CK e AST. La diagnosi è confermata dal test PCR su sangue. Si pensa ci sia un effetto tossico diretto di *Anaplasma* sulle cellule muscolari. Il trattamento si basa sull'uso di ossitetraciclina o doxiciclina e terapia di supporto (Hilton et al., 2008).

2.3.2.5 Porpora emorragica ed infartuale

La porpora emorragica è una malattia non contagiosa dei cavalli caratterizzata da vasculite che determina edemi diffusi ed emorragie mucosali e del tessuto sottocutaneo. Si pensa che la malattia rappresenti una conseguenza dell'infezione o dell'esposizione a batteri quali *Streptococcus equi equi*, *Streptococcus equi zooepidemicus*, *Rhodococcus equi*,

Corynebacterium pseudotuberculosis o persino della vaccinazione contro *S. equi equi* (Pusterla et al., 2003).

Una forma di porpora emorragica infartuale dei cavalli somiglia alla sindrome di Henoch-Schonlein dell'uomo (van der Boon et al., 2005). Sono colpiti comunemente cavalli giovani o adulti (Pusterla et al., 2003).

I segni clinici si sviluppano in modo acuto entro 2-4 settimane dopo un'infezione delle vie respiratorie. I più comuni segni di miopatia includono gonfiore muscolare e rigidità con aumento dell'attività degli enzimi muscolari (CK > 50.000 IU/L e AST > 1000 IU/L) (Kaese et al., 2005; Pusterla et al., 2003).

Inoltre, si osservano un importante edema sottocutaneo di tutti e quattro gli arti, letargia, anoressia, emorragie sulle membrane mucose, febbre e tachicardia (Pusterla et al., 2003). Comuni alterazioni ematiche sono rappresentate da neutrofilia con deviazione a sinistra, ipoalbuminemia, e anomalie dei parametri della coagulazione.

I cavalli affetti mostrano elevati titoli anticorpali contro la proteina M di *S. equi* all'ELISA.

Istologicamente, si osserva una grave necrosi multifocale coagulativa del muscolo scheletrico. Le cellule dell'infiltrato infiammatorio sono costituite principalmente da neutrofili degenerati, linfociti, plasmacellule e macrofagi. Diversi altri tessuti (es. polmoni, fegato, intestino) possono presentare lesioni emorragiche e vasculiti leucoclastiche che possono evolvere in infarti (Kaese et al., 2005).

Il tasso di mortalità dei cavalli con porpora emorragica era del 7,5% in uno studio retrospettivo (Pusterla et al., 2003). Tuttavia, gli episodi fatali sono frequenti in caso di forme infartuali (Kaese et al., 2005).

Perché il trattamento sia efficace è necessaria una diagnosi precoce, somministrazione di penicillina per 14 giorni e terapia ad alte dosi di desametasone (0,12-0,2 mg/kg) per almeno 10 giorni, seguita da dosi a scalare di prednisolone iniziando con un dosaggio di 2 mg/kg. La mancata somministrazione aggressiva di farmaci steroidei determina la progressione della patologia con infarcimento intestinale e morte.

2.3.3 Miosite immuno-mediata

La miosite immuno-mediata (IMM) nei cavalli è caratterizzata da atrofia muscolare a rapida insorgenza ed evoluzione, letargia, rigidità, debolezza e febbre (Lewiss et al., 2007). È una patologia molto frequente nei Quarter horses, ma possono essere colpite anche altre razze (Lewiss et al., 2007). Il

40% per cento circa dei cavalli affetti ha un'anamnesi infettiva riferibile a *S. equi* o a una patologia respiratoria nei due mesi antecedenti la comparsa della sintomatologia (Lewiss et al., 2007). È stata osservata una distribuzione bimodale per età, con un primo picco nei cavalli di età inferiore agli 8 anni ed un altro in soggetti di età superiore ai 16 anni. I muscoli più severamente colpiti da atrofia sono i muscoli del dorso a livello toracico-lombare. L'atrofia può progredire arrivando a coinvolgere il 50% della massa muscolare in una sola settimana, portando a debolezza generalizzata. Atrofia focale simmetrica dei muscoli cervicali è stata riportata in un pony con polimiosite immunomediata (Barrott et al., 2004). Le alterazioni ematologiche generalmente si limitano ad aumenti da lievi a moderati degli enzimi sierici CK e AST, ma possono anche non esserci modificazioni in alcuni casi cronici. La biopsia muscolare dei muscoli epiassiali e glutei negli stati acuti mostra una vasculite linfocitaria, atrofia angolare, infiltrazione linfocitaria delle miofibre, necrosi fibrile con infiltrazione macrofagica e rigenerazione. Le biopsie dei muscoli semitendinoso e semimembrano possono mostrare atrofia e vasculite, ma gli infiltrati infiammatori possono non essere evidenti (Lewiss et al., 2007). Gli infiltrati linfocitari sono costituiti principalmente da cellule CD4+ (linfociti T helper CD4+).

Tuttavia, nelle aree più severamente infiammate si possono riscontrare anche un minor numero di linfociti B, plasmacellule e linfociti CD8+ (linfociti T citotossici). Questo distingue la polimiosite immunomediata equina da quella umana e canina, in cui la popolazione linfocitaria predominante è rappresentata da cellule CD8+ (Figarella-Branger et al., 2003; Pumarola et al., 2004).

Pare esistano delle somiglianze immunopatogenetiche tra le miositi equine immunomEDIATE e la miosite dei muscoli masticatori del cane (Pumarola et al., 2004), che pure prevedono una prevalente attivazione dei CD4+ con il coinvolgimento dell'MHC II (Complesso Maggiore di Istocompatibilità di tipo II).

Nell'uomo le miositi immunomEDIATE sono caratterizzate da due tipi di infiltrato: uno di tipo endomisiale, composto principalmente da linfociti T CD8+ e macrofagi, che testimoniano una reazione immunitaria che ha come target le stesse fibrocellule muscolari; ciò caratterizza tipicamente le IBM e le PM; il secondo tipo invece prevede un infiltrato infiammatorio di tipo perivascolare e caratterizzato principalmente da linfociti T CD4+ e linfociti B, il che testimonia una reazione infiammatoria diretta contro gli endoteli dei vasi intramuscolari (Grundtman et al., 2007). Studi recenti indicano inoltre che alcuni HLA (human leucocyte antigen) siano più suscettibili di

altri allo sviluppo di miosite immunomediata, suggerendo un possibile fattore genetico nell'eziologia della patologia (Chinoy et al., 2011).

I cavalli colpiti da miosite immunomediata in genere recuperano la massa muscolare nel giro di settimane o mesi. Tuttavia sono possibili sequele a lungo termine quali atrofia muscolare focale o reiterazione dei segni clinici. La terapia precoce a base di corticosteroidi determina un rapido miglioramento dei segni clinici. Tuttavia, i soggetti affetti possono ritrovare la loro massa muscolare nel giro di pochi mesi anche senza trattamento steroideo (Lewiss et al., 2007). Questo differisce da quanto accade in cani affetti da miopatie immunomediate, in cui in assenza di una rapida ed aggressiva terapia immunosoppressiva la progressione dell'atrofia muscolare risulta inevitabile (Evans et al., 2004; Pumarola et al., 2004).

2.3.4 Miopatia immuno-mediata da Theileria equi e Babesia caballi

Uno studio molto recente condotto su cavalli di razza Trottatore Italiano ha permesso di descrivere per la prima volta una miopatia infiammatoria in corso di Piroplasmosi cronica (Pasolini et al. 2018). I cavalli mostrano atrofia muscolare da moderata a grave, diminuzione delle performances atletiche, affaticamento e perdita di peso. La miopatia riscontrata in corso di piroplasmosi cronica sembra riconoscere una patogenesi di tipo immuno-mediato. Il danno muscolare è dovuto allo sviluppo di autoanticorpi contro gli antigeni muscolari. Inoltre in corso di Piroplasmosi cronica, uno stimolo sconosciuto potrebbe attivare una serie di vie infiammatorie con conseguente sovraespressione sarcolemmica di MHC I e II, che a loro volta attirerebbe i linfociti T i quali esacerbano e perpetuano la miopatia infiammatoria. Come accade in altre miopatie immuno-mediate (Dalkas, 2011), le infezioni croniche non causano danni muscolari attraverso una replica diretta dell'agente nel muscolo, ma innescano invece una risposta infiammatoria persistente con cellule T attivate. Sono comunque necessari ulteriori studi per stabilire un legame diretto tra infezione cronica da piroplasma e miosite immuno-mediata, come, ad esempio, l'identificazione di linfociti T clonali attivati stimolati da antigeni di piroplasma (Pasolini et al., 2018).

- Aleman M, Riehl J, Aldridge BM, Lecouteur RA, Stott JL, Pessah IN. Association of a mutation in the ryanodine receptor 1 gene with equine malignant hyperthermia. *Muscle Nerve* 2004;30:356–65.
- Aleman M, A review of muscle disorders. *Neuromuscul Disord* 2008; 18:277-87.
- Alouf JE, Muller-Alouf H. Staphylococcal and Streptococcal superantigens: molecular, biological and clinical aspects. *Int J Med Microbiol* 2003;292:429–40.
- Barrott MJ, Brooks HW, McGowan CM. Suspected immune-mediated myositis in a pony. *Equine Vet Educ.* 2004;16(2):58–61.
- Beech J. Chronic exertional rhabdomyolysis. *Vet Clin North Am Equine Pract* 1997;13:145–68.
- Briani C, Doria A, Sarzi-Puttini P, Dalakas MC. Update on idiopathic inflammatory myopathies. *Autoimmunity* 2006;39:161–70.
- Brown EJ. The molecular basis of streptococcal toxic shock syndrome. *N Engl J Med* 2004;350:2093–4.
- Bruehaus, B.A., Brown, C.M., Scott, E.A., Ainsworth, D.M. and Taylor, R.F. (1983) Clostridial muscle infections following intramuscular injections in the horse. *J. equine vet. Sci.* 3, 42-46.
- Charge S., Rudnicki M. Cellular Regulation of Molecular Muscle Regeneration. *Physiol Rev.* 2004;84:209-234.
- Chinoy H., Lamb J. A., Ollier W., and Cooper R. G. Recent advances in the immunogenetics of idiopathic inflammatory myopathy. *Arthritis Research & Therapy* 2011, 13:216.
- Cuddon P.A. Electrophysiology in neuromuscular disease. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 32 (2002), pp. 31-62
- Dalakas MC. Review: an update on inflammatory and autoimmune myopathies. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2011;37(3):226–242.
- De Girolami U., Smith T. W. (1982) Pathology of Skeletal Muscle Diseases. *The American Journal of Pathology* Vol 107 (2): 235-276
- Dickinson PJ, LeCouteur RA (2002) Muscle and nerve biopsy. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* Jan;32(1):63-102, vi.
- Divers TJ, Cummings JE, de Lahunta A, Hintz HF, Mohammed HO. Evaluation of the risk of motor neuron disease in horses fed a diet low in vitamin E and high in copper and iron. *Am J Vet Res* 2006;67:120–6.
- Divers TJ, Mohammed HO, Cummings JF, et al. Equine motor neuron disease: findings in 28 horses and proposal of a pathophysiological mechanism for the disease. *Equine Vet J* 1994;26:409–15
- Eisen A. Recent considerations in the etiopathogenesis of ALS. *Suppl Clin*

- Neurophysiol 2004;57:187–90.
- Evans J, Levesque D, Shelton GD. Canine inflammatory myopathies: a clinicopathologic review of 200 cases. *J Vet Intern Med* 2004;18:679–6791.
- Figarella-Branger D, Civatte M, Bartoli C, Pellissier JF. Cytokines, chemokines, and cell adhesion molecules in inflammatory myopathies. *Muscle Nerve* 2003;28:659–82.
- Grefte S., Kuijpers-Jagtman A., Torensma R., et al. Skeletal muscle development and regeneration. *Stem Cells Dev.* 2007;16:857-868.
- Grundtman C, Malmström V, Lundberg IE. Immune mechanisms in the pathogenesis of idiopathic inflammatory myopathies. *Arthritis Res Ther.* 2007;9(2):208.
- Hilton H, Madigan JE, Aleman M. Rhabdomyolysis associated with *Anaplasma phagocytophilum* infection in a horse. *J Vet Intern Med.* 2008;22(4):1061–1064
- Horner, R.F. (1982) Malignant oedema caused by *Clostridium perfringens* type A in a horse. *Tdskr. S. Afr. vet. Ver.* 53, 122-123.
- Hulland T. Pathology of domestic animals, ed 3. Orlando, FL: Academic Press; 1985.
- Hunyadi, L. , Sundman, E. , Kass, P. , Williams, D. and Aleman, M. (2017), Clinical Implications and Hospital Outcome of Immune-Mediated Myositis in Horses. *J Vet Intern Med*, 31: 170-175. doi:10.1111/jvim.14637
- Jeffcott L: 5th International Conference on Equine Exercise Physiology, Suffolk: Equine Veterinary Journal, 1999
- Joyce NC, Oskarsson B, Jin L-W. Muscle Biopsy Evaluation in Neuromuscular Disorders. *Physical medicine and rehabilitation clinics of North America.* 2012;23(3):609-631. doi:10.1016/j.pmr.2012.06.006.
- Kaese HJ, Valberg SJ, Hayden DW, et al. Infarctive purpura hemorrhagica in five horses. *J Am Vet Med Assoc* 2005;226:1893–8.
- Ledwith A, McGowan CM. Muscle biopsy: A routine diagnostic procedure. *Equine Vet Educ.* 2004;April:84-89
- Lewis SS, Valberg SJ, Nielsen IL. Suspected immune-mediated myositis in horses. *J Vet Intern Med.* 2007 May-Jun;21(3):495-503.
- McCue, M, Ribiero W, Lewis S and Valberg SJ. Prevalence of polysaccharide storage myopathy in horses with neuromuscular disorders. *Equine Veterinary Journal Suppl.*36 2006:340-344.

- McEwen S., Hulland T. Histochemical and morphometric evaluation of skeletal muscle from horses with exertional rhabdomyolysis (tying-up). *Vet Pathol.* 1986;23:400.
- Montagna P, Liguori R, Monari L, et al. Equine muscular dystrophy with myotonia. *Clin Neurophysiol.* 2001;112:294-299.
- Naylor JM, Robinson JA, Crichlow EC, Steiss JE. Inheritance of myotonic discharges in american quarter horses and the relationship to hyperkalemic periodic paralysis. *Can J Vet Res.* 1992;56:62-66.
- Oredsson S., Plate G., Qwvarfordt P. Allopurinol-a free radical scavenger reduces reperfusion injury in skeletal muscle. *European J Vasc Surg.* 1991;5:47.
- Paciello O, Oliva G, Gradoni L, Manna L, Foglia Manzillo V, Wojcik S, Trapani F, Papparella S. Canine inflammatory myopathy associated with *Leishmania Infantum* infection. *Neuromuscul Disord.* 2009 Feb;19(2):124-30. doi: 10.1016/j.nmd.2008.10.013 Epub 2008 Dec 11.
- Pasolini, M.P., Pagano, T.B., Costagliola, A., Biase, D.D., Lamagna, B., Auletta, L., Fatone, G., Greco, M., Coluccia, P., Vincenzo, V., Pirozzi, C., Raso, G.M., Santoro, P., Manna, G., Papparella, S. and Paciello, O. (2018) Inflammatory Myopathy in Horses With Chronic Piroplasmiasis. *Vet. Pathol.* 55, 133-143.
- Peek SF, Semrad SD, Perkins GA. Clostridial myonecrosis in horses (37 cases 1985–2000). *Equine Vet J* 2003;35:86–92.
- Platt S.R., Garosi L.S. Neuromuscular weakness and collapse (2004) *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 34 (6 SPEC.ISS.), pp. 1281-1305.
- Pumarola M, Moore PF, Shelton GD. Canine inflammatory myopathy: analysis of cellular infiltrates. *Muscle Nerve* 2004;29:782–9.
- Perdrizet, J.A., Callihan, D.R., Rebhun, W.C. and Shin, S. (1987) Successful management of malignant oedema caused by *Clostridium septicum* in a horse. *Cornell Vet.* 77, 328-338.
- Pusterla N, Watson JL, Affolter VK, Magdesian KG, Wilson WD, Carlson GP. Purpura haemorrhagica in 53 horses. *Vet Rec* 2003;153:118–21.
- Rebhun, W.C., Shin, S., King, J.M., Baum, K.H. and Patten, V. (1985) Malignant oedema in horses. *J. Am. vet. med. Ass.* 187, 732-736.
- Reed SM, Hegreberg GA, Bayly WM, Brown CM, Paradis MR, Clemmons RM. Progressive myotonia in foals resembling human dystrophia myotonica. *Muscle Nerve.* 1988;11:291-296.

- Robinson JA, Naylor JM, Crichlow EC. Use of electromyography for the diagnosis of equine hyperkalemic periodic paresis. *Can J Vet Res.* 1990;54:495-500.
- Rudolph JA, Spier SJ, Byrns G, Rojas CV, Bernoco D, Hoffman EP. Periodic paralysis in Quarter Horses: a sodium channel mutation disseminated by selective breeding. *Nat Genet* 1992;2:144–7.
- Shelton G. (2004) Muscular dystrophies: expanding our knowledge in companion animals. *The Veterinary Journal*, 168, 1, (6).
- Snow D., Guy P. Percutaneous needle muscle biopsy in the horse. *Equine Vet J.* 1976;8:150.
- Sponseller BT, Valberg SJ, Tennent-Brown BS, Foreman JH, Kumar P, Timoney JF. Severe acute rhabdomyolysis associated with *Streptococcus equi* infection in four horses. *J Am Vet Med Assoc* 2005;227:1800–7, [753–4].
- Steinberg S, Botelho S. Myotonia in a horse. *Science.* 1962;137:979-980.
- Valberg S.J. Diagnostic approach to muscle disorders. *Proceedings of the American Association of Equine Practitioners* 2006;52:340–6.
- Valberg S.J. 1996. Muscular causes of exercise intolerance in horses. *Vet. Clin. North Am., Equine. Pract.* 12:495-515.
- Valberg, S.J. and McKinnon, A.O. (1984) Clostridial cellulitis in the horse: a report of 5 cases. *Can. vet. J.* 25, 67-71.
- Valberg S, Jonsson L, Lindholm A, et al. Muscle histopathology and plasma aspartate aminotransferase, creatine kinase and myoglobin changes with exercise in horses with recurrent exertional rhabdomyolysis. *Equine Vet J* 1993;25: 11–16.
- Valberg S.J., Mickelson JR, Gallant EM, MacLeay JM, Lentz L, De la Corte F. Exertional rhabdomyolysis in Quarter Horses and Thoroughbreds: one syndrome, multiple aetiologies. *Equine Vet J Suppl* 1999;30:533–8.
- Valentine, B. A., Divers, T. J., Murphy, D. J. and Todhunter, P. G. (1998), Muscle biopsy diagnosis of equine motor neuron disease and equine polysaccharide storage myopathy. *Equine Veterinary Education*, 10: 42-50.
- van der Boon F, Groeneweg M. Acute abdominal pain as the first sign of Henoch-Schonlein purpura: a hidden diagnosis in the absence of purpura. *Ned Tijdschr Geneesk* 2005;149:2522-6.
- Vattemi G, Mirabella M, Guglielmi V, et al. Muscle biopsy features of idiopathic inflammatory myopathies and differential diagnosis. *Auto-Immunity Highlights.* 2014;5(3):77-85. doi:10.1007/s13317-014-0062-2.

- Westermann C., Dorland J., Wijnberg I., et al. Equine metabolic myopathies with emphasis on the diagnostic approach Comparison with human myopathies. *Vet Q.* 2007;29:42-59.
- Wijnberg ID, Back W, de Jong M, Zuidhof MC, van den Belt AJ, van der Kolk JH. The role of electromyography in clinical diagnosis of neuromuscular locomotor problems in the horse. *Equine Vet J.* 2004;36:718-722.
- Wijnberg ID, Franssen H, Jansen GH, Back W, van der Kolk JH. Quantitative electromyographic examination in myogenic disorders of 6 horses. *J Vet Intern Med.* 2003;17:185-193.
- Ward TL, Valberg SJ, Adelson DL, Abbey CA, Binns MM, Mickelson JR. Glycogen branching enzyme (GBE1) mutation causing equine glycogen storage disease IV. *Mamm Genome* 2004;15:570–7.
- Westermann C., Dorland J., Wijnberg I., et al. Equine metabolic myopathies with emphasis on the diagnostic approach Comparison with human myopathies. *Vet Q.* 2007;29:42-59.
- Wrogemann K., Pena S. Mitochondrial calcium overload: A general mechanism for cell necrosis in muscle disease. *Lancet.* 1976;1:672.

Capitolo 3

La Piroplasmosi Equina

Le infezioni da *Babesia* hanno complicato la vita degli esseri umani fin dall'antichità, soprattutto attraverso le infezioni del bestiame domestico. Probabilmente il primo riferimento registrato di babesiosi si legge nel libro dell'Esodo (09:03) in cui è descritta una piaga del bestiame del faraone egiziano Ramses II, forse causata da *Babesia bovis*, con emoglobinuria come segno prevalente. Tuttavia, il genere non è stato formalmente riconosciuto fino a quando nel 1888 Babes descrisse un patogeno intraeritrocitario (che credeva essere un batterio) responsabile di emoglobinuria febbrile in bovini rumeni (Babes, 1888).

Il primo a descrivere un caso di babesiosi equina in Sud Africa fu Wiltshire nel 1883 che la denominò "febbre da antrace" (de Waal e Van Heerden, 2004). Una condizione simile fu chiamata "febbre biliare" nel Capo di Hutcheon. Il Colonnello Nunn (1888) la considerava come una "forma biliosa" di peste equina. Tuttavia, Hutcheon sosteneva che la febbre biliare fosse una malattia diversa. La stessa malattia fu descritta come malaria equina in Africa occidentale. Nel 1893 Smith e Kilborne riconobbero *Babesia* quale protozoo trasmesso dal morso di zecca che si rendeva responsabile della febbre bovina del Texas. Nel 1901-1902 Theiler dimostrò che la febbre biliare non era identica alla peste equina, ma poteva verificarsi in concomitanza ad essa (de Waal et al., 2004). Un microorganismo chiamato *Piroplasma equi* fu descritto da Laveran nel 1901 (Schein, 1988; de Waal et al., 2004; Uilenberg, 2006), dall'esame di strisci ematici di cavalli sudafricani (Schein, 1988; de Waal et al., 2004).

Dopo qualche polemica nel corso degli anni circa la classificazione di questo microorganismo, alla fine esso fu collocato nel genere *Theileria* (de Waal et al., 2004; Uilenberg, 2006). Koch nel 1904 individuò due forme morfologicamente diverse di *Babesia* in Zimbabwe, che successivamente furono considerati da Nuttall e Strickland come agenti causali di babesiosi equina (de Waal et al., 2004). Il nome *Piroplasma caballi* venne suggerito per il più grande dei due parassiti (Schein, 1988; de Waal et al., 2004).

Per molti anni si cercò di determinare quali specie di *Babesia* causassero segni clinici d'infezione nel cavallo. Col passare del tempo però, le differenze esistenti in termini di morfologia, ciclo biologico, vettore e suscettibilità alla chemioterapia divennero evidenti tra i due parassiti (de Waal et al., 2004).

Holbrook (1969) considerò la piroplasmosi equina (EP), avvenuta dopo l'importazione di 30 pony da Cuba in Florida, come un'infezione mista da *Babesia caballi* e *Theileria equi*. Nel 1961 ad un cavallo da parata del Dipartimento di Polizia di Miami fu diagnosticata un'infezione da *Babesia*

caballi. Nel 1962, quando la malattia si diffuse alla maggior parte del sud della Florida, si comprese che la zecca tropicale del genere *Dermacentor* rappresentava il vettore della malattia. Dal 1962, la babesiosi equina si registra regolarmente in Florida. Nel 1969 la malattia raggiunse uno stato di endemia nel sud della Florida, in cui la maggior parte dei cavalli risultavano portatori a basso titolo (Holbrook, 1969).

3.1 Background

La piroplasmosi equina (EP) è una malattia protozoaria che si riscontra in cavalli, muli, asini e zebre caratterizzata da anemia emolitica acuta (Friedhoff et al. 1990). Gli agenti eziologici sono due protozoi emoparassiti, *Babesia equi* (Leveran, 1901), oggi riclassificata come *Theileria equi* (Mehlhorn and Schein, 1998) e *Babesia caballi* (Nuttall and Strickland, 1910), trasmessi principalmente da zecche del genere *Ixodes*. La piroplasmosi si rinviene in tutte le regioni in cui sono presenti le zecche vettore, nonché nelle regioni tropicali, subtropicali ed in alcune regioni temperate (de Waal 1992; Maurer 1962; Friedhoff and Soulé 1996). I cavalli infetti da *T. equi* restano sieropositivi per tutta la vita mentre quelli infetti da *B. caballi* risulteranno sieropositivi per diversi anni. In generale, le infezioni da *Babesia caballi* sono clinicamente più miti e meno comuni di quelle causate da *Theileria equi*, seppure in relazione all'area geografica considerata ed alla diffusione dei vettori l'epidemiologia e l'evoluzione clinica della malattia possono variare (Phipps, 1996; Donnellan et al., 2003; de Waal et al., 2004).

Le perdite economiche associate a questa patologia sono significative ed includono i costi per la terapia, specialmente nei cavalli con infezione acuta, aborti, calo delle performances, morte e restrizione delle esportazioni o della partecipazione ad eventi sportivi, in particolare nei paesi considerati *Babesia-free*.

3.2 Eziologia e ciclo biologico

Il genere *Babesia* appartiene al phylum *Apicomplexa*, classe *Sporozoasida*, sottoclasse *Coccidiasina*, ordine *Eucoccidiorida*, sottordine *Piroplasmorina* e famiglia *Babesiidae* (de Waal et al., 2004).

Babesia equi, è stata successivamente riclassificata come *Theileria equi* (Mehlhorn e Schein, 1998).

Il ciclo biologico di *Babesia* spp. può essere suddiviso in tre fasi (Fig. 3.1). Una gamogonia iniziale, che è una fase sessuale in cui gameti si fondono all'interno dell'epitelio intestinale di una zecca infetta. Questa fase è seguita dalla fase di sporogonia, una fase di riproduzione asessuata nella ghiandola salivare dell'ospite invertebrato. Segue la merogonia, che consiste invece in una fase di moltiplicazione asessuata all'interno degli eritrociti dell'ospite vertebrato o, in caso di *Theileria equi*, anche all'interno dei linfociti (schizogonia) (Vial et al., 2006).

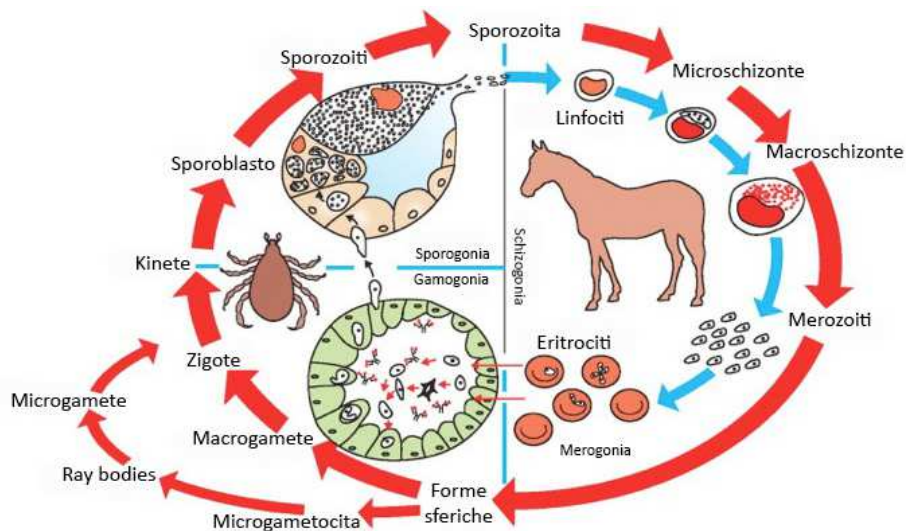


Fig. 3.1 Ciclo biologico di *B. caballi* e *T. equi*. In quest'ultima manca la trasmissione transovarica e può essere presente uno stadio pre-eritrocitario nei linfociti (modificato da *Equine Infectious Diseases*, Debra C. Sellon, Maureen Long, Elsevier Health Sciences, 2006 modificato).

3.2.1 *Theileria equi*

Theileria equi è un parassita più piccolo di *Babesia caballi* (Mehlhorn and Schein, 1998; de Waal et al., 2004) e, a differenza di altri *Babesia* spp., presenta una fase di schizogonia nei linfociti dell'ospite vertebrato (Schein, 1988; Brüning, 1996; Uilenberg, 2006).

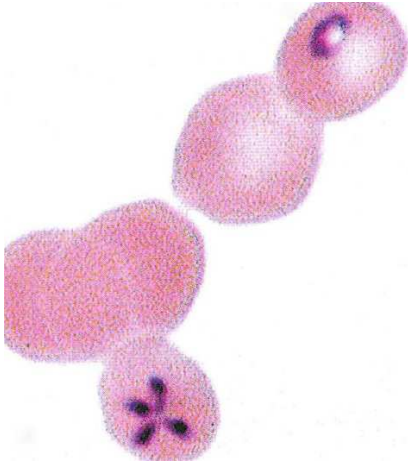


Fig. 3.2 Sangue equino contenente un singolo organismo intra-eritrocitario di *T. equi* (in alto) ed una croce di Malta formata da quattro organismi (in basso). (Colorazione Wright - Giemsa) (da *Veterinary hematology - A diagnostic guide and color atlas*. Harvey. Elsevier-Saunders. 2001).

Il parassita si sviluppa entro cinque giorni nelle ghiandole salivari della zecca vettore infetta (Schein, 1988; de Waal et al., 2004). Ciò si verifica dopo che la zecca adulta infetta si attacca ad un ospite vertebrato (Schein, 1988; de Waal et al., 2004; Uilenberg, 2006). La trasmissione transtadiale avviene per iniezione di saliva infetta nell'ospite vertebrato. In questo caso la zecca dopo la trasmissione non risulta più infetta (Uilenberg, 2006).

Dai 12 ai 14 giorni dopo il primo attacco delle zecche infette, vengono rilasciati i merozoiti, che invadono quindi gli eritrociti. Nella fase intra-eritrocitaria si formano i trofozoiti ed i merozoiti. Questi ultimi, di forma piriforme, si dispongono all'interno degli eritrociti in numero di due o quattro (fig. 3.2), formando figure a croce di Malta (Schein, 1988; Vial et al., 2006).

3.2.2 *Babesia caballi*

Babesia caballi si moltiplica asessualmente solo negli eritrociti dell'ospite vertebrato (Schein, 1988; Brüning, 1996; de Waal et al., 2004). All'interno di globuli rossi dell'ospite, i merozoiti piriformi si ritrovano in genere in coppie disposte ad angolo acuto (fig. 3.3) (Schein, 1988; de Waal et al., 2004).

Questo parassita induce generalmente una parassitemia molto bassa, che si aggira attorno allo 0,1 % di eritrociti infetti (de Waal et al. 2004).

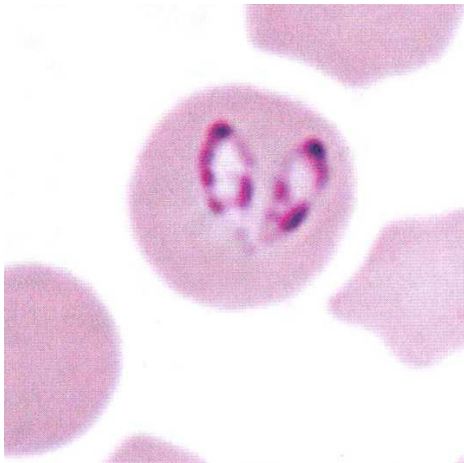


Fig. 3.3 Due organismi piriformi di *Babesia caballi* in un eritrocita equino nella caratteristica disposizione ad angolo (Diff-Quik®, x100 oil magnification, colorazione Wright - Giemsa)

3.3 Distribuzione

Infezioni sostenute da *Theileria equi* e *Babesia caballi* sono state segnalate in Spagna (Camacho et al., 2005), Portogallo, Francia, Belgio, Polonia, in ampie aree dell'ex URSS (Joyner et al., 1981), ed Italia (Schein, 1988; de Waal et al., 2004, Bartolomé Del Pino et al., 2016).

La Babesiosi è presente anche in Asia (Donnelly et al., 1980), in Medio Oriente (Hailat et al., 1997) ed è endemica in Cina (Xu et al., 2003) e in Mongolia (Boldbaatar et al., 2005). Inoltre è ampiamente presente in Africa (Gummow et al., 1996; Heerden, 1996; de Waal et al., 2004; Madden e Holbrook, 1968; Carbrey et al., 1971), Sud America (Ribeiro et al., 1999), Florida (Holbrook, 1969) e alcune regioni Australiane (Schein, 1988; de Waal et al., 2004).

Si pensa generalmente che la distribuzione geografica della piropalamosi equina dipenda dalla distribuzione dei vettori invertebrati (Donnellan et al., 2003; de Waal et al., 2004). Gummow et al. (1996), invece, non ha riportato alcuna correlazione tra la prevalenza di babesiosi equina e la distribuzione delle zecche vettore in Sudafrica (Gummow et al., 1996).

Diverse specie di zecche sono state identificate come vettori naturali o sperimentali di Piroplasmosi. *Babesia caballi* è trasmessa da 15 diverse specie (7 *Dermacentor* [Anocenter] sp., 6 *Hyalomma* sp., e 2 *Rhipicephalus* sp.) mentre *Theileria equi* da 14 specie (4 *Dermacentor* sp., 4 *Hyalomma* sp., 5 *Rhipicephalus* [Boophilus sp.], e *A. cajennense*). *Babesia caballi* si caratterizza per avere un tipo di trasmissione sia transtadiale che transovarica all'interno della zecca (de Waal, 1990). *Theileria equi* ha generalmente una trasmissione transtadiale ed intrastadiale (Ueti et al., 2008). È possibile una trasmissione transovarica di *Theileria equi*, ma non si conosce bene che ruolo possa svolgere dal punto di vista epidemiologico (Ikadai, 2007; Moltmann 1983).

Le zecche appartenenti al genere *Dermacentor* trasmettono solo *Babesia caballi* in Europa centrale, Asia centrale (Phipps et al., 1996) e Florida (Frerichs et al., 1969), mentre quelle appartenenti alla specie *Rhipicephalus evertsi evertsi* possono trasmettere sia *Theileria equi* che *Babesia caballi* in Africa (Heerden, 1996; Phipps et al., 1996) e solo *Theileria equi* in Sud Africa (de Waal et al., 2004). *Rhipicephalus bursa* è segnalato come vettore di entrambi i parassiti in Europa meridionale (Scoles e Ueti, 2015) e in Asia Minore (Phipps et al., 1996). In Sud Africa *Rhipicephalus sanguineus* trasmette *Theileria equi* e *Babesia caballi*, mentre *Rhipicephalus turanicus* trasmette *Theileria equi* (de Waal e Van Heerden, 2004). Le zecche del

genere *Hyalomma* trasmettono *Theileria equi* e *Babesia caballi* in Sud Europa, Medio, Vicino ed Estremo Oriente ed in Nord Africa (Phipps et al., 1996). *Hyalomma truncatum* è responsabile della trasmissione transovarica di *Babesia caballi* in Africa australe (Donnellan et al., 2003; de Waal et al., 2004).

È stato inoltre segnalato che *Boophilus microplus* può trasmettere *Theileria equi* ad animali sensibili (Guimaraes et al., 1998; de Waal et al., 2004).

Nord Europa, Regno Unito, Irlanda e Nuova Zelanda sono tra le poche regioni in cui non è stata riportata la presenza della malattia (Donnelly et al. 1980; Phipps et al. 1996).

È interessante notare come, per quanto riguarda il territorio italiano, la mappa di distribuzione fornita dall'Organizzazione Mondiale della Sanità indichi una assenza della patologia da gennaio 2016 ad oggi (fig. 3.4).

C'è da dire però che non tutti i paesi forniscono dati completi rendendo difficile una comprensione accurata della distribuzione parassitaria (World Animal Health Information Database (WAHID)).

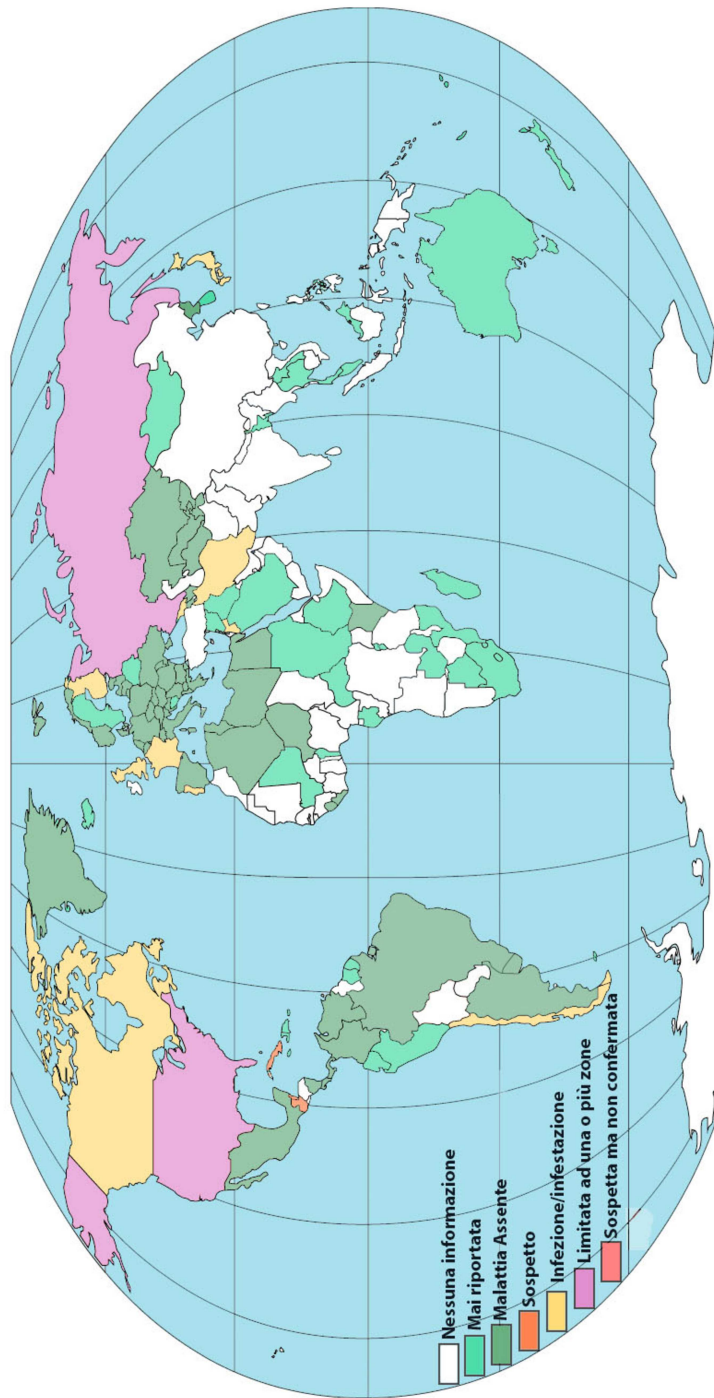


Fig. 3.4 Distribuzione mondiale della piroplasmosi equina (Fonte OIE, WAHID. Periodo: gennaio 2016 settembre 2018 modificato)

3.3.1 Epidemiologia in Italia

I dati riguardanti la distribuzione delle infezioni da piroplasmi nell'ambito della popolazione equina italiana risultano piuttosto frammentari e riferiti, principalmente, ad animali ad attitudine sportiva (Bertoldini et al., 1977; Lillini et al., 1981; Mancianti et al., 2000; Bartolomé Del Pino et al., 2016). Oltre all'interesse suscitato dall'impatto che tali emoparassiti hanno sul calo delle performance sportive del cavallo-atleta, contributi a differenziato indirizzo scientifico, volti a chiarire quanto il background genetico di determinate razze possa influire sulla resistenza naturale all'infezione, potrebbero aprire fruttuose e lungimiranti linee di ricerca.

Osservazioni condotte su popolazioni numericamente ridotte e relegate in realtà territoriali ristrette potrebbero essere di notevole ausilio, come nel caso di cavalli di razza Murghese in Puglia (Ceci et al., 1993; Cito et al., 2005) ed asini amiadini in Toscana (Nardoni et al., 2007).

D'altronde, analogamente a quanto osservato per altre specie d'interesse zootecnico quali pecore e bovini (Ceci et al., 1993; Ceci e Carelli, 1999; Pieragostini e Petazzi, 2000), è ipotizzabile anche per la specie equina una variabilità di risposta alle infezioni da emoprotozoi nell'ambito delle singole razze.

Uno studio epidemiologico condotto su cavalli di razza Tolfetana (Veronesi et al., 2010) allevati tradizionalmente con sistema brado o semibrado nelle province di Roma e Viterbo ed impiegati prevalentemente in attività di tipo ricreativo (turismo equestre), produzione di carne, oltre che per il tradizionale governo delle mandrie di bovini ha evidenziato un'elevatissima diffusione dell'infezione da piroplasmi tra i cavalli di questa razza.

La sieroprevalenza quasi assoluta (93,88%) riscontrata per *T. equi* può essere attribuita sia all'ampia diffusione dei vettori nell'area oggetto di studio, precedentemente accertata da indagini sulla fauna ixodologica locale (Sobrero e Manilla, 1988), sia al ruolo di reservoir svolto dal cavallo stesso. Per quanto riguarda i valori di sieroprevalenza per *B. caballi*, il dato ottenuto (48,58%) risulta elevato e superiore a quelli riportati da analoghi studi condotti su cavalli gestiti allo stato brado e semibrado in Abruzzo e Toscana (Savini et al., 1997). L'analisi della varianza ha escluso associazioni statisticamente significative tra percentuali di sieropositività per *B. caballi* e sesso degli animali, di contro l'età si è rivelata un fattore in grado di incidere significativamente; tali risultati concordano con la letteratura scientifica esistente (Di Corinto et al., 2007; Moretti et al., 2009; Scala et al., 2006). È interessante notare l'alto indice di prevalenza (40%) osservato

tra i puledri di età inferiore ad 1 anno che può essere senz'altro ricondotto alla tipologia di gestione dei cavalli Tolfetani i quali, essendo allevati costantemente al pascolo fin dalla nascita, secondo gli autori, contraggono l'infezione molto precocemente e tendono a sviluppare prontamente una forte risposta anticorpale verso i parassiti al decadere dell'immunità passiva (Veronesi et al., 2010). In realtà questi puledri potrebbero nascere infetti in seguito al passaggio del parassita per via transplacentare (Allsopp et al., 2007; -Georges, 2011; Phipps e Otter, 2004). Infine, l'elevata variabilità nel tasso di sieropositività a *B. caballi* riscontrata a livello aziendale potrebbe essere connessa al biotopo del vettore biologico (reservoir): è probabile che, all'interno di un'area endemica come quella della Tolfa, sussistano dei microfocolai ad elevatissima endemia determinati dal maggiore adattamento delle zecche vettrici.

In un altro lavoro effettuato in nord e centro Italia (Moretti et al., 2010) sono stati individuati valori di sieroprevalenza diversi a seconda dell'area geografica coinvolta, essendo il nostro paese caratterizzato da diverse zone climatiche, almeno quattro: regioni montane dell'entroterra, regioni collinari interne, regioni collinari litoranee e pianure. I valori riscontrati (50,4% per *T. equi* e 56,06% per *B. caballi*) indicano un grado molto alto di esposizione a Babesia nonché una notevole presenza di entrambe le specie contemporaneamente. Se confrontati con i dati presenti in letteratura (Semproni et al., 1987), si rileva una tendenza all'aumento della sieropositività.

I cambiamenti climatici negli ultimi decenni hanno probabilmente portato ad una più ampia distribuzione delle zecche vettore e l'estensione dei loro periodi di attività. Di conseguenza le possibilità di trasmissione dei parassiti possono risultare maggiori, mentre l'aumento della diffusione di *B. caballi* (56,06%) potrebbe essere legato alla persistenza del parassita in cavalli allevati allo stato brado o semibrado.

L'età e la stagione non influenzavano, nei lavori citati, la positività sierologica, mentre inverni miti sembrano favorire la presenza di zecche in modo uniforme durante tutto l'anno (Moretti et al., 2010). Cavalli di razza TPR sembrano essere esposti ad entrambe le specie di piroplasmi da sole o in associazione, mentre cavalli da sella (utilizzati principalmente per la monta in campagna), da cross, pony e muli sono risultati esposti a *B. caballi* e ad infezioni miste. I bassi tassi d'infezione osservati soprattutto nei cavalli sportivi potrebbero riflettere una ridotta esposizione alle zecche ed una migliore gestione dei programmi di controllo dei parassiti (Moretti et al., 2010).

Il pascolo rappresenta un fattore di rischio per la prevalenza di entrambe le specie. Al pascolo c'è il doppio delle possibilità che un cavallo sia sieropositivo a *T. equi*, 11 volte a *B. caballi* e 9 volte ad entrambe le specie (Moretti et al., 2010).

Uno studio condotto su 294 cavalli in una zona rurale del nord Italia (Grandi et al., 2011) ha riportato una sieroprevalenza dell'8,5%: in particolare, l'8,2% degli animali era positivo per gli anticorpi anti-*T. equi* e lo 0,3% per gli anticorpi anti-*B. caballi*.

Un altro recente lavoro condotto su 300 cavalli di Umbria, Lazio e Marche (Laus et al., 2013) riguardante la prevalenza di vari patogeni trasmessi dal morso di zecca ha rilevato, per le specie di nostro interesse, una sieroprevalenza rispettivamente del 41.0% e del 26.0% per *T. equi* e *B. caballi* in accordo con quanto evidenziato da precedenti studi sia in Italia (Bertoldini et al., 1977; Mancianti et al., 2000) che in Galizia, Spagna (Camacho et al., 2005).

3.4 Infezione

La trasmissione dei parassiti avviene attraverso il morso di una zecca infetta durante la quale il microorganismo in fase infettante viene trasmesso al mammifero ospite attraverso il fluido salivare (Phipps et al., 1996; Uilenberg, 2006; Vial et al., 2006). La zecca risulta infettante solo pochi giorni dopo l'attacco all'ospite e solo dopo la maturazione degli sporozoi al suo interno (Uilenberg, 2006). A seconda della zecca vettore il periodo di incubazione varia tra 2-10, fino a 21 giorni (Mehlhorn et al., 1998).

Theileria equi segue solo una trasmissione transtadiale (Phipps et al., 1996; Mehlhorn et al., 1998; Uilenberg, 2006).

L'infezione da *Babesia caballi* può essere trasmessa in maniera transtadiale da *Rhipicephalus evertsi evertsi* e in maniera transovarica da *Hyalomma truncatum*. Inoltre, l'infezione può dipendere dall'inoculazione di sangue infetto in animali sensibili, così come attraverso l'uso di aghi ipodermici contaminati (Short et al., 2012; Gerstenberg et al., 1998).

Tuttavia, la trasmissione mediata da insetti ematofagi deve ancora essere provata (Donnellan et al., 2003; de Waal et al., 2004). È stata inoltre segnalata la possibilità di infezioni *in-utero* a feti equini con entrambi gli agenti di Piroplasmosi (Schein, 1988; Phipps et al., 1996; de Waal et al., 2004).

3.5 Patogenesi

Theileria equi è altamente patogena e può infettare fino all'80% degli eritrociti (Mehlhorn et al., 1998). L'anemia progressiva è caratteristica delle infezioni da *Theileria equi* (de Waal et al., 2004), così come vari gradi di trombocitopenia, ipofosfatemia, anemia ferropriva e iperbilirubinemia, che accompagnano i picchi di parassitemia (de Waal et al., 1987; de Waal et al., 2004).

L'infezione da *T. equi* o *B. caballi* provoca lisi degli eritrociti caratterizzata da vari gradi di anemia emolitica. La rottura degli eritrociti durante il rilascio degli stadi merozoitici provoca anemia emolitica intravascolare. I globuli rossi infetti sono rimossi dal circolo dall'intervento di macrofagi splenici che contribuiscono ulteriormente all'anemia emolitica.

La struttura biochimica delle membrane eritrocitarie cambia drasticamente durante l'infezione da *T. equi* (Ambawat et al. 1999). Questo cambiamento conformazionale causa una ridotta deformabilità dei globuli rossi, che potrebbe portare a un ridotto flusso sanguigno microvascolare.

I livelli plasmatici di malondialdeide (marker di perossidazione lipidica) si presentano significativamente aumentati il che suggerisce che anche l'accumulo di ioni ossidativi contribuisca alla lisi degli eritrociti (Ambawat et al. 1999). Questi parassiti alterano anche la coagulazione nei cavalli infetti attraverso meccanismi ad oggi poco conosciuti.

I parassiti del genere *Babesia* dipendono dai globuli rossi per il loro approvvigionamento energetico e l'assorbimento del fosforo eritrocitario, il che determina ipofosfatemia e fragilità eritrocitaria (de Waal et al., 2004). Negli esseri umani l'ipofosfatemia determina l'esaurimento dell'adenosina trifosfato (ATP) che, a sua volta, predispone gli eritrociti all'emolisi. Nei cavalli gravemente colpiti l'emolisi può portare a nefrosi ed uremia emoglobinurica. Infezioni concomitanti, come le verminosi, possono complicare la babesiosi equina e portare a conseguenze gravissime come la coagulazione intravasale disseminata (de Waal et al., 2004).

La patogenesi delle infezioni da *Babesia caballi* invece è legata all'accumulo di eritrociti parassitati in piccoli vasi sanguigni e nei capillari (Schein, 1988; de Waal et al., 2004). Gli eritrociti infettati da *B. caballi* causano microtrombi aggregandosi all'interno di piccoli vasi, portando a stasi venosa e vasculite (Allen et al. 1975; de Waal et al. 1987).

Uno stato ipotensivo acuto può causare morte improvvisa. In corso d'infezione i cavalli colpiti possono morire per edema polmonare, sviluppare laminite o, in alcuni casi, presentare stasi gastrointestinale.

Entrambi i parassiti sono spesso causa d'infezioni subcliniche che si presentano con una diminuzione dell'ematocrito e della conta piastrinica (de Waal et al., 2004).

3.6 Segni clinici

L'attività stagionale dei vettori determina una maggiore frequenza dei sintomi clinici durante i mesi estivi (de Waal et al., 2004). La fase clinicamente manifesta si verifica dopo un periodo di incubazione che va dai 5 ai 30 giorni dopo il morso da parte della zecca infetta (Holbrook, 1969; Schein, 1988; Phipps et al., 1996; de Waal et al., 2004).

Le infezioni sostenute da *Babesia caballi* in genere sono clinicamente inapparenti e raramente portano ad una grave anemia. Occasionalmente possono, però, determinare inappetenza cronica, calo del rendimento, perdita di peso, pallore delle mucose, tachicardia e lieve splenomegalia (de Waal et al., 2004).

Una rara e iperacuta forma di babesiosi è stata riportata da de Waal et al. in Sud Africa (2004).

La forma acuta è caratterizzata da febbre, anoressia, depressione, ittero, anemia emolitica, petecchie mucosali e dispnea (Schein, 1988; Phipps et al., 1996; de Waal et al., 2004). L'emoglobinuria, un sintomo spesso descritto in corso di babesiosi in altre specie, è meno frequente nella specie equina (Schein, 1988; Phipps et al., 1996).

Oltre ai sintomi suddetti, casi subacuti possono presentare diversi gradi di anoressia, perdita di peso, temperatura rettale elevata o normale, aumento della frequenza cardiaca e respiratoria, coliche, costipazione seguita da diarrea, splenomegalia e, talvolta, emoglobinuria. Le mucose possono variare dal rosa pallido al giallo pallido o al giallo brillante.

Lieve inappetenza, calo delle performances, perdita di peso, splenomegalia e talvolta pallore delle mucose e lieve tachicardia sono descritti nelle fasi croniche (de Waal et al., 2004). L'intenso esercizio fisico può predisporre i cavalli alla manifestazione clinica della malattia (Hailat et al., 1997).

La babesiosi neonatale nei puledri è caratterizzata da debolezza alla nascita o nelle ore immediatamente successive, sviluppo precoce di anemia, ittero, malessere, febbre ed emorragie petecchiali (de Waal et al., 2004).

Sintomi nervosi sono stati solo raramente descritti in equini affetti da piroplasmosi, tuttavia, in giovani puledri infettati con *Theileria equi* sono stati segnalati atassia, tremori generalizzati e da lievi a moderati spasmi tonico-clonici.

Ulteriori complicazioni della babesiosi equina sono rappresentate da insufficienza renale acuta, coliche associate ad enterite, polmonite, ipofertilità negli stalloni e aborti nelle cavalle (de Waal et al., 2004).

3.7 Patologia

La patologia clinica si manifesta generalmente con una diminuzione della concentrazione di emoglobina, della conta eritrocitaria e delle piastrine (de Waal et al., 2004; Camacho et al., 2005), così come neutropenia e linfopenia nei casi acuti (de Waal et al., 2004). La bilirubina sierica totale, l'urea, l'aspartato aminotransferasi (AST), la creatina chinasi (CK), la γ -glutamilttransferasi (GGT) e la lattato deidrogenasi (LDH) possono risultare aumentati in particolare in cavalli infetti con *Theileria equi*, a causa dell'anemia emolitica e della degenerazione centrolobulare associata a necrosi degli epatociti (Camacho et al., 2005).

Macroscopicamente la piroplasmosi equina è caratterizzata da lesioni riferibili ad anemia emolitica ed iperbilirubinemia causate dall'infezione. Reperti postmortalmente frequenti nelle infezioni acute includono edema sottocutaneo della parte inferiore del corpo e delle estremità, essudati sierosi in tutte le cavità del corpo, splenomegalia (Schein, 1988; Phipps et al., 1996; de Waal et al., 2004), così come epato e nefromegalia (Schein, 1988; Phipps et al., 1996).

Microscopicamente i reperti più comuni sono rappresentati da estesi danni renali, quali degenerazione dell'epitelio tubulare e deposizione di emoglobina e da danni epatici, quali necrosi centrolobulare e infiltrazione cellulare dei sinusoidi. Una marcata pigmentazione itterica delle sierose ed edema polmonare sono più frequenti in corso di infezione da *Babesia caballi* mentre la linfadenopatia generalizzata è stata osservata più spesso in infezioni sostenute da *Theileria equi* (Schein, 1988; Phipps et al., 1996).

I feti abortiti ed i puledri neonati affetti possono presentare anemia da moderata a grave, ittero, petecchie a carico delle sierose, idrotorace, congestione ed edema polmonare, nonché spleno ed epatomegalia (de Waal et al., 2004).

3.8 Diagnosi

La diagnosi di babesiosi equina può essere fatta prendendo in considerazione i segni clinici, mediante l'esame microscopico di strisci di sangue, attraverso l'inoculazione di sangue in un animale sensibile (Frerichs et al., 1969; Phipps et al., 1996; de Waal et al., 2004), oppure utilizzando tecniche molecolari come la reazione a catena della polimerasi (PCR) (Rampersad et al., 2003; Alhassan et al., 2005; Vial et al., 2006). A causa della bassa parassitemia la dimostrazione del parassita in strisci di sangue è spesso molto difficile (Heerden, 1996; Phipps et al., 1996; de Waal et al., 2004). Risulta perciò preferibile la prova di fissazione del complemento (CFT) su sangue intero (Frerichs et al., 1969; Schein, 1988; Brüning, 1996; de Waal et al., 2004), tecnica che permette anche di differenziare le infezioni da *Babesia caballi* e da *Theileria equi* (Madden et al., 1968; Weiland, 1986). La CFT in combinazione con l'immunofluorescenza indiretta (IFA) è il test più indicato per la rilevazione di animali portatori e di casi cronici (Tenter e Friedhoff, 1986; Weiland, 1986) e ai fini di screening su cavalli esportati in paesi esenti dalla malattia (Schein, 1988; Phipps et al., 1996; Brüning, 1996; de Waal et al., 2004). Tuttavia, sia CFT (Phipps et al., 1996) che IFA (de Waal et al., 2004) presentano limitazioni quali la possibilità di falsi positivi, falsi negativi e reazioni crociate (Joyner et al., 1981; Tenter et al., 1986; Weiland, 1986; Brüning, 1996).

Più recentemente sono stati utilizzati test immunoenzimatici (ELISA) in cavalli infettati sperimentalmente ma sono state riscontrate anche in questo caso delle cross-reazioni (Weiland, 1986; de Waal et al., 2004). Nuovi test ELISA basati su antigeni ricombinanti (Katz et al., 2000) e anticorpi monoclonali specifici sono stati sviluppati per la rilevazione di entrambi i parassiti ma, anche se la sensibilità sembra essere migliore del CFT, si raccomandano ulteriori studi di convalida (de Waal et al., 2004).

Sono state inoltre sviluppate indagini su DNA per la rilevazione diretta di *Babesia* spp. (Phipps et al., 1996), in grado di rilevare il DNA del parassita nel sangue delle zecche infette (Brüning, 1996). Con questo metodo, è possibile evidenziare una parassitemia di *Theileria equi* equivalente a meno dello 0,0025% (Posnett et al., 1991). I recenti progressi nel metodo di coltura *in vitro* dei piroplasma equini hanno portato inoltre all'identificazione di *Theileria equi* e *Babesia caballi* anche in soggetti microscopicamente e sierologicamente negativi. È un metodo molto sensibile che consente di rilevare anche parassitemie pari a $10^{-10}\%$ (de Waal et al., 2004).

Ancora più recente è il metodo di PCR a ciclo singolo o multiplex, sviluppato per la rilevazione simultanea di *Theileria equi* e *Babesia caballi* è uno strumento molto utile per la diagnosi di laboratorio di routine di piroplasmosi equina (Leal et al., 2011).

La babesiosi equina si verifica comunemente in concomitanza ad altre malattie o infezioni per cui deve essere sempre tenuto in considerazione questo tipo di possibilità (Heerden, 1996).

Le differenze di sensibilità ai farmaci tra *Theileria equi* e *Babesia caballi* rende necessaria una diagnosi eziologica accurata al fine di indirizzare correttamente la terapia (de Waal et al., 2004).

3.8.1 Diagnosi differenziale

Nella diagnosi clinica differenziale, bisogna considerare patologie come l'influenza equina, l'encefalosi equina e l'anemia infettiva equina.

Nei puledri appena nati è opportuno considerare le infezioni da Equine herpesvirus-1 e l'ittero neonatale iso-eritrolitico.

L'infezione erpetica va valutata anche in caso di aborto nelle fattrici (de Waal et al., 2004).

3.9 Immunità

È ormai risaputo che l'infezione da entrambi i parassiti si traduce in uno stato di portatore che conferisce protezione contro la patologia. Non esiste alcuna protezione crociata documentata tra *T. equi* e *B. caballi*, in quanto i cavalli possono essere infettati contemporaneamente da entrambi i parassiti (Maurer, 1962).

I cavalli possono rimanere portatori per un massimo di quattro anni dopo un'infezione da *Babesia caballi* e probabilmente per tutta la vita dopo l'infezione da *Theileria equi* (Holbrook, 1969; Schein, 1988; Phipps et al., 1996; de Waal et al., 2004). Gli animali portatori rappresentano un serbatoio per l'infezione delle zecche, ricoprendo un importante ruolo epidemiologico nel mantenimento del parassita in natura (Holbrook, 1969; Phipps et al., 1996; Donnellan et al., 2003; de Waal et al., 2004).

Gummow et al. (1996) hanno documentato una più alta prevalenza anticorpale per *Babesia caballi* nei puledri rispetto alle puledre.

Nella maggior parte delle aree endemiche, i puledri che ingeriscono il colostro da una cavalla portatrice sono protetti dall'infezione e dalla malattia clinica per i primi 1-5 mesi di vita e fino a 9 mesi (de Waal, 1992; Donnellan and Marais, 2009). Con il declino degli anticorpi materni, il puledro diventa suscettibile all'infezione e la maggior parte dei giovani cavalli delle zone endemiche risultano infetti dall'età di 2 anni. È stato anche suggerito che i puledri possano nascere come *inapparent carriers* di *T. equi*, il che conferirebbe anche un certo livello di protezione (Donnellan and Marais, 2009). Raramente, i portatori sani di *T. equi* possono presentare recidive di malattia clinica in seguito a stress, esercizio fisico, immunosoppressione e somministrazione di steroidi (Hailat et al., 1997; Oladosu, 1988; Oladosu e Olufemi, 1992).

In uno studio in Brasile, Ribeiro et al. (1999) hanno rilevato la presenza di anticorpi in cavalli di tutte le età, anche se meno frequentemente in puledri di sei mesi di vita o più giovani (Ribeiro et al., 1999).

3.10 Risposta immunitaria in corso di Babesiosi

Nel corso dell'evoluzione i parassiti hanno sviluppato sistemi in grado di eludere il sistema immunitario dell'ospite al fine di assicurarsi un periodo di sopravvivenza il più lungo possibile a spese del suo organismo.

Tuttavia, in presenza di parassitosi l'organismo animale mette in atto una serie di risposte immunologiche abbastanza tipiche, che determinano anche alterazioni ematobiochimiche e sierologiche che possono facilitare la diagnosi di malattia parassitaria.

In generale, riguardo alle infezioni protozoarie, vengono attivate o una risposta anticorpale specifica, se si tratta di protozoi extracellulari, oppure una risposta immunitaria cellulo-mediata nel caso di quelli intracellulari, come appunto per *Babesia*.

3.10.1 Risposta cellulo-mediata

La popolazione cellulare più attiva nel contrastare i protozoi intracellulari è quella di linfociti T (di cui tutte le sottopopolazioni esprimono l'antigene CD 3), tra cui i Linfociti T CD4+ ed i Linfociti T CD8+.

I linfociti T CD8+ riconoscono gli antigeni, generalmente endogeni, presentati sulla superficie delle cellule infette contestualmente alle molecole del complesso maggiore di istocompatibilità di classe I (Poli, 1996).

I linfociti T CD4+ invece, riconoscono antigeni esogeni presentati nell'ambito delle molecole del complesso maggiore di istocompatibilità di tipo II e innescano tutta una serie di processi di attivazione dei linfociti B che portano alla produzione di anticorpi propri della risposta umorale.

È ormai ampiamente riconosciuto che le cellule del sistema immunitario innato rappresentano importanti fattori di controllo sul grado di infettività dei protozoi limitando la portata della parassitemia. Non è del tutto chiaro, invece, come queste cellule interferiscano con lo sviluppo dei parassiti, in particolare nel caso di parassiti che infettano gli eritrociti (cioè, *Plasmodium* e *Babesia* spp.).

Un possibile responsabile di questa inibizione è il rilascio di interferone gamma (IFN- γ) da parte delle cellule natural killer (NK) e di fattore di necrosi tumorale alfa (TNF- α), ossido nitrico (NO) e specie reattive dell'ossigeno (ROS) prodotti dai macrofagi (Frölich, 2011).

Le possibilità di guarigione da infezioni acute e croniche indotte da parassiti del *Phylum* degli Apicomplexa (tra cui *Plasmodium*, *Toxoplasma* e *Babesia*) sembra dipendere molto dalla risposta immunitaria che coinvolge i linfociti

T CD4+. Infatti, topi knock-out (KO) per il complesso di istocompatibilità di classe II (e quindi carenti di cellule T CD4+) risultavano più suscettibili a questo tipo di infezioni (Frolich et al., 2011).

Le stesse fibrocellule muscolari, in alcune circostanze, possono comportarsi da APC (antigen presenting cells) esponendo antigeni leucocitari di classe I e II (Paciello et al., 2009), anticorpi, fattori complemento ecc., svolgendo dunque un ruolo attivo nella risposta infiammatoria oltre che subirne le conseguenze (Frölich, 2011).

Nel corso di infestazioni croniche e persistenti, la risposta immunitaria comporta frequentemente danni rilevanti ai tessuti e agli organi dell'ospite attraverso diversi meccanismi immunopatologici, come accade ad esempio nelle forme autoimmuni. Anche nella patogenesi delle miositi immunomediate, descritte finora in diverse specie animali, sono stati ipotizzati meccanismi di tipo autoimmunitario innescati da diversi fattori, tra cui potenzialmente anche le malattie parassitarie (Frölich, 2011).

La risposta immunitaria in corso di Babesiosi equina non è mai stata studiata in maniera dettagliata; tuttavia, diversi studi sono stati condotti riguardo le infezioni sostenute da altre specie di *Babesia*, come la *B. microti* dell'uomo e la *B. divergens* del bovino. Inoltre, data la localizzazione intraeritrocitaria del parassita, diverse analogie sono state riscontrate nella risposta immunitaria innescata da *Babesia spp.* e quella da *Plasmodium spp.* nella specie umana (Clark and Allison, 1974).

3.10.2 Principali citochine prodotte in corso di babesiosi

Le citochine più comunemente riscontrate in corso di infezioni da *B. microti* nel topo sono l'IL-10, prodotta dai linfociti T CD4+ e l'IFN- γ .

Pare inoltre che la secrezione di questa citochina influenzi la sopravvivenza del protozoo negli eritrociti dell'ospite, in quanto topi incapaci di produrre IL-10 risultavano meno sensibili all'infezione (Young et al., 2012).

In corso di malaria, invece, le interleuchine più coinvolte nel determinismo delle conseguenze sistemiche dell'infezione sono l'IL-1, l'IL-6 e l'IFN- γ (Clark et al., 2006) (fig. 3.5).

L'IL-1 e il TNF- α (detta anche cachettina) sono citochine infiammatorie ad azione simile, prodotte dai macrofagi, dai fibroblasti, dalle cellule endoteliali e da quelle epiteliali, che riconoscono come principali citotipi bersaglio i linfociti T e B ed i leucociti polimorfo nucleati. Nel cavallo è stato inoltre dimostrato che l'IL-1 e il TNF- α stimolano l'adesione agli endoteli e la diapedesi granulocitaria (Bailey et al., 2001).

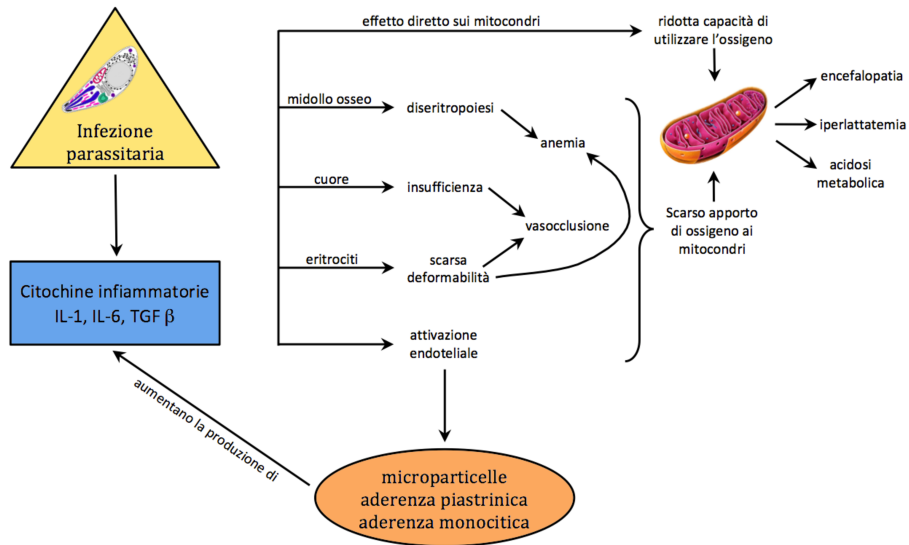


Fig. 3.5 *Influenza delle citochine sulle condizioni che determinano la limitata disponibilità di ossigeno e la ridotta funzionalità mitocondriale in corso di infezione malarica (da Clark, 2006 modificato)*

TNF- α interagisce con due tipi di recettori cellulari (I e II), inducendo una polimerizzazione che innesca la trasduzione del segnale; le conseguenze della stimolazione da parte di questa citochina sono molto diverse a seconda del tipo di recettore che interagisce con il ligando, della sua dose e delle modalità di rilascio: mentre, infatti, l'attivazione di recettori tipo II da parte di basse dosi di ligando rilasciate in maniera acuta stimola l'attivazione di un segnale pro-infiammatorio e di sopravvivenza cellulare mediato dal fattore di trascrizione NF- κ B, il rilascio cronico ad alti livelli di TNF, che interagisce con recettori di tipo I, innesca un programma di morte programmata mediante l'attivazione della cascata proteolitica delle caspasi. Il TNF- α è coinvolto in molti processi patologici a carico del tessuto muscolare, intervenendo come fattore pro-necrotizzante, anche sui mioblasti in diverse patologie come le distrofie muscolari, l'insufficienza cardiaca e le broncopatie croniche ostruttive. Inoltre, pare che l'inibizione del segnale mediato dal NF- κ B e attivato dal TNF- α risulti protettiva contro l'atrofia muscolare indotta da denervazione (Mourkioti et al., 2006). Ancora, il TNF- α è in grado di antagonizzare gli effetti biologici dell'IGF-1 (insulin growth factor 1) sul tessuto muscolare; ciò avviene sia attraverso una down-

regolazione locale della sintesi di IGF-1 (Frost, 2003) che attraverso l'inibizione intracellulare del pathway di segnale innescato dal legame di IGF-1 con i suoi recettori. Gli effetti del TNF- α variano a seconda del tipo fibrale coinvolto: sulle fibre di tipo II si comporta infatti principalmente come un fattore proapoptotico, mentre su quelle di tipo I fa da segnale pro-infiammatorio (Phillips e Leeuwenburgh., 2005).

L'IL-6, se espressa a bassi livelli, si comporta come un fattore di crescita muscolare, mentre l'esposizione cronica ad alti livelli di IL-6 determina atrofia muscolare, come dimostrato in modelli murini che sovra-esprimono tale citochina (Tsujinaka et al., 1996).

In corso di Malaria, sono descritti diversi casi di danno muscolare, in alcuni casi associata a rabdomiolisi (anche in assenza di CPKemia elevata) e insufficienza renale progressiva (Yong et al., 2012).

Episodi di rabdomiolisi sono stati descritti anche in 2 casi di babesiosi canina (Jacobson et al., 1996), anche in questo caso associata ad insufficienza renale. La patogenesi della rabdomiolisi indotta da babesiosi non è ancora del tutto chiara, ma le cause più probabili coinvolgono il danno ipossico a carico del muscolo, dovuto ad esempio alla parziale ostruzione dei vasi intramuscolari da parte degli eritrociti parassitati e dal rilascio sistemico di citochine ad azione cachettizzante come l'IL-1, e l'IFN- γ e prodotti infiammatori come il monossido di Azoto (NO).

3.10.3 Risposta umorale

Il ruolo della risposta umorale in corso di babesiosi è stato studiato nella specie bovina, in cui l'agente eziologico è rappresentato da *B. divergens*.

Nel complesso, il ruolo protettivo degli anticorpi nelle infezioni *B. divergens* è poco conosciuto. È stato suggerito che gli anticorpi possano inibire l'entrata di merozoiti nei globuli rossi, come dimostrato durante studi in vitro con *B. microti*. Inoltre, alcune opsonine possono stimolare la fagocitosi di eritrociti infetti. Tuttavia, il trasferimento passivo d'immunità agli animali sensibili con sieri da animali immuni ha successo solo raramente. Durante la parassitemia primaria, la risposta umorale sembra avere poca importanza. Nei bovini infetti da *B. divergens*, si può dimostrare la presenza di anticorpi anche prima che gli eritrociti infetti appaiano negli strisci di sangue, il che indica che non hanno alcun effetto inibitorio sulla moltiplicazione del parassita. Durante le infezioni secondarie, il grado di protezione anticorpale sembra dipendere dall'alta specificità di alcuni anticorpi piuttosto che dal livello totale di anticorpi anti-*B. divergens*; infatti

animali resistenti spesso hanno livelli anticorpali molto bassi. D'altra parte, i bovini possono mantenere elevati livelli di anticorpi per lunghi periodi di tempo, anche quando la protezione è cessata.

Queste osservazioni suggeriscono che, come altri protozoi, *B. divergens* ha probabilmente sviluppato antigeni immunodominanti che inducono alte concentrazioni di anticorpi non protettivi.

La lisi dei corpi parassitari mediata dal complemento non sembra essere un importante meccanismo effetore umorale, infatti colture *in vitro* di *B. divergens* crescono bene in mezzi supplementati con siero bovino (Zintl et al., 2003).

3.11 Terapia

Nelle regioni endemiche, il trattamento farmacologico viene utilizzato per ridurre i segni clinici. In quelle non endemiche in cui si cerca di restare in uno stato di piropallosi free, il trattamento dei cavalli infetti ha lo scopo di portare alla sterilizzazione. Le infezioni da *T. equi* sono più difficili da trattare rispetto a quelle da *B. caballi*. Numerosi farmaci sono stati proposti ed utilizzati per la loro efficacia nell'inibire *T. equi* e *B. caballi* sia su colture cellulari che in vivo (Schwint et al., 2009; Nagai et al., 2003; Bork et al., 2003). Storicamente, è stato riportato che l'infezione da *B. caballi* era auto-limitante con clearance osservata dopo diversi anni, tuttavia non è sempre così (Holbrook, 1969). È stata anche riportata la possibilità di una clearance farmacologica nei confronti di *T. equi*, ma lo studio è stato condotto prima dello sviluppo di test con maggiore sensibilità per la persistenza del parassita (Frerichs et al., 1973; Frerichs and Holbrook 1974). Fino a poco tempo fa si pensava che la chemosterilizzazione di un soggetto infetto da *T. equi* fosse irrealizzabile. I dati raccolti durante l'epidemia in Texas indicano che *T. equi* può essere eliminato da un cavallo infetto con un dosaggio appropriato di imidocarb dipropionato (ID) (Ueti et al., 2012).

Nonostante siano stati numerosi i farmaci utilizzati, sicuramente l'imidocarb dipropionato (ID) risulta il più efficace. La forma alternativa di questo farmaco, composta da sale diidro-cloridrico, causa un danno muscolare più grave nel sito di iniezione (Frerichs et al., 1973; Meyer et al., 2005). L'ID viene somministrato per via intramuscolare. Sebbene il meccanismo d'azione non sia chiaro, i meccanismi proposti includono l'inibizione dell'ingresso dell'inositolo negli eritrociti infetti o l'alterazione nel metabolismo delle poliammine (Bacchi et al., 1981; McHardy et al., 1986). Dopo l'iniezione intramuscolare, l'ID viene rapidamente eliminato dal plasma, ma rimane sequestrato in alcuni tessuti corporei (Belloli et al., 2002). I dosaggi segnalati per alleviare i segni clinici variano, tuttavia la maggior parte delle fonti indica che una singola somministrazione a 2.2-4.4 mg/kg di ID risulta efficace. Se necessario, dosaggi più bassi possono essere ripetuti a intervalli di 24-72 ore per 2-3 trattamenti. Nelle nazioni non endemiche in cui si desidera la sterilizzazione, gli animali infetti da *B. caballi* possono essere trattati con una dose di 4,4 mg/kg di im ogni 72 ore per 4 trattamenti (Schwint et al., 2009). Per la sterilizzazione nei confronti di *T. equi*, dati provenienti da cavalli sia naturalmente che sperimentalmente infetti indicano che la stessa dose è efficace (Ueti et al., 2012; Grause et al., 2013). Dei 25 cavalli naturalmente infetti trattati, uno è rimasto positivo per

T. equi dopo il trattamento iniziale ed è stato sottoposto a un secondo trattamento per ottenere la chemio-sterilizzazione (Ueti et al., 2012). Per quanto riguarda i cavalli infettati sperimentalmente da *T. equi*, 1 cavallo è rimasto resistente all'eliminazione del parassita (Grause et al., 2013). Attualmente, la clearance è determinata da risultati negativi alla PCR e dall'incapacità di trasmettere il parassita a soggetti splenectomizzati mediante trasfusione di sangue, ma sono necessari ulteriori studi per definire più chiaramente la questione (Ueti et al., 2012).

L>ID ha attività anticolinesterasica, quindi sono spesso presenti reazioni al farmaco che si estrinsecano in sudorazione, agitazione, coliche e diarrea (Meyer et al., 2005; Adams 1981). In genere, questi segni sono transitori e raramente pericolosi per la vita. Gli effetti possono essere prevenuti con la somministrazione di una dose singola endovenosa di glicopirolato a 0,0025 mg/kg o risolti con una singola dose endovenosa di atropina a 0,2 mg/kg. Entrambi questi farmaci anticolinergici causano anche effetti avversi. La somministrazione di n-butilscolopolamina può attenuare i segni clinici senza aggiunta di effetti avversi (Ueti et al., 2012). Poiché l>ID è soggetto a clearance epatica e renale, può verificarsi tossicità con necrosi epatica periportale e necrosi dei tubuli renali con tossicità (Meyer et al., 2005; Adams, 1981). Durante il trattamento possono essere osservati iperazotemia transitoria, aumento del rapporto GGT/creatinina od anche aumenti transitori dell'attività degli enzimi epatici (AST, ALT, ALP e SDH), ma in genere si risolvono una volta sospeso il trattamento.

Asini e muli sono altamente sensibili all>ID il che rende questa molecola poco raccomandabile per l'uso in queste specie (Frerichs et al., 1973). Le informazioni riguardo il trattamento di puledri neonati affetti da *T. equi* con ID si limitano ad un solo caso clinico (Silvey, 1996). Quando una cavalla in allattamento riceve una dose singola di ID a 2,4 mg/kg IM, questo si riscontra nel latte 2 ore dopo la somministrazione (Bellolli et al., 2002) anche se non è chiaro se possa portare a tossicità nel puledro. È stata segnalata una correlazione tra la somministrazione di ID a cavalle gravide e successivo aborto indotto con livelli circolanti fetali di ID paragonabili alle concentrazioni sieriche della madre (Lewis et al., 1999).

Anche il diminazene aceturato ed il diaminazene diacetato sono stati usati con successo contro *T. equi* e *B. caballi* ad una dose di 3,5 mg/kg IM a distanza di 48 ore per 2 trattamenti (Rashid et al., 2008). La forma aceturata è più efficace di quella diacetata, ma entrambi i farmaci si sono dimostrati agenti causali di importanti danni muscolari al sito di iniezione. L'efficacia di entrambi i farmaci aumenta con la seconda somministrazione ma non è

stata segnalata alcuna sterilizzazione. Segni di tossicità includono distress respiratorio e letargia.

Le ossitetracicline, quando somministrate per via endovenosa alla dose di 5-6 mg/kg una volta al giorno per 7 giorni consecutivi sono risultate efficaci contro *T. equi*, ma non contro *B. caballi* (Zobba et al., 2008). Altri farmaci per cui è stata testata un'efficacia nel trattamento della babesiosi includono l'amicarbilide isotionato, l'euflavina, i derivati dell'arteminsina, il buparvaquone e l'atovaquone, tuttavia questi farmaci non sono comunemente utilizzati nella pratica (Donnellan e Marais, 2009; Kumar et al., 2003; Zaugg e Lane 1989). Il ponazuril inibisce *T. equi* in vitro (Wise et al., 2012) ma non è stato effettuato ancora nessun test in vivo. È possibile che questa classe di farmaci possa offrire un'ulteriore opzione terapeutica nel cavallo.

A parte i farmaci antiprotozoari, i cavalli con infezione acuta spesso richiedono terapie di supporto che includono fluidi per via endovenosa, farmaci anti-infiammatori non steroidei, gestione del dolore e trasfusioni di sangue. Un'idratazione adeguata è essenziale all'inizio e durante il trattamento con imidocarb.

- Adams LG. Clinicopathological aspects of imidocarb dipropionate toxicity in horses. *Res Vet Sci* 1981;31:54–61.
- Allen PC, Frerichs WM, Holbrook AA. Experimental acute *Babesia caballi* infections. I. Red blood cell dynamics. *Exp Parasitol* 1975;37:67–77.
- Georges KC, Ezeokoli CD, Sparagano O, et al. A case of transplacental transmission of *Theileria equi* in a foal in Trinidad. *Vet Parasitol* 2011;175:363–366.
- Allsopp MT, Lewis BD, Penzhorn BL. Molecular evidence for transplacental transmission of *Theileria equi* from carrier mares to their apparently healthy foals. *Vet Parasitol* 2007;148:130–136
- Alhassan A, Pumidonming W, Okamura M, Hirata H, Battsetseg B, Fujisaki K, Yokoyama N, and Igarashi I (2005) Development of a single-round and multiplex PCR method for the simultaneous detection of *Babesia caballi* and *Babesia equi* in horse blood. *Vet Parasitol*, 129, 43-49.
- Ambawat HK, Malhotra DV, Kumar S, et al. Erythrocyte associated haemato-biochemical changes in *Babesia equi* infection experimentally produced in donkeys. *Vet Parasitol* 1999;85:319– 324.
- Babes V. Sur l'hémoglobinurie bactérienne boeuf. *Compt Rend Acad Sci* 1888; 107:692-4.
- Bacchi CJ, Nathan HC, Hutner SH, et al. Prevention by polyamines of the curative effect of amicarbalide and imidocarb for *Trypanosoma brucei* infections in mice. *Biochem Pharmacol* 1981;30:883–886.
- Bailey SR, Cunningham FM. Inflammatory mediators induce endothelium-dependent adherence of equine eosinophils to cultured endothelial cells. *J Vet Pharmacol Ther.* 2001 Jun;24(3):209-14.
- Bartolomé Del Pino LE, Nardini R, Veneziano V, et al. *Babesia caballi* and *Theileria equi* infections in horses in central-southern Italy: sero-molecular survey and associated risk factors. *Ticks Tick Borne Dis.* 2016;7(3):462–469.
- Belloli C, Crescenzo G, Lai O, et al. Pharmacokinetics of imidocarb dipropionate in horses after intramuscular administration. *Equine Vet J* 2002;34:625–629.
- Bertoldini, G., Codazza, D. and Radaelli, G. 1977. La diagnosi sierologica (FdC) applicata alla piroplasmosi equina. *S.I.S.Vet. proceedings* 31: 759-760.
- Boldbaatar D, Xuan X, Battsetseg B, Igarashi I, Battur B, Batsukh Z, Bayambaa B, and Fujisaki K (2005) Epidemiological study of equine piroplasmosis in Mongolia. *Vet Parasitol*, 127, 29-32.

- Bork S, Yokoyama N, Matsuo T, et al. Clotrimazole, ketoconazole, and clodinafop-propargyl as potent growth inhibitors of equine Babesia parasites during in vitro culture. *J Parasitol* 2003;89:604–606.
- Brüning A (1996) Equine piroplasmiasis: an update on diagnosis, treatment and prevention. *British Veterinary Journal*, 152, 139-151.
- Camacho AT, Guitian FJ, Pallas E, Gestal JJ, Olmeda AS, Habela MA, Telford SR, III, and Spielman A (2005) Theileria (Babesia) equi and Babesia caballi infections in horses in Galicia, Spain. *Trop Anim Health Prod*, 37, 293-302.
- Carbrey EA, Avery RJ, Knowles RC, and Sash SC (1971) Chemotherapy of equine babesiosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 159, 1538-1545.
- Ceci L, Carelli G. Tick-borne diseases of livestock in Italy: general review and results of recent studies carried out in the Apulia region. *Parassitologia*. 1999 Sep;41 Suppl 1:25-9. Review.
- Ceci, L., Petazzi, F., Carelli, G., Sasanelli, M., Semproni, G., 1993. Babesiosi equina latente in Puglia. In: Proceeding of XLVII National Congress of S.I.S. Vet., Riccione, Italy, vol. 47. pp. 1385–1389.
- Cito AM, Rubino G, Lacinio R, Bramante G, Caroli A, Pieragostini E, Petazzi F (2005) Ematologia del cavallo Murgese in ambiente condizionato da MTZ (malattie trasmesse da zecche). *Atti SIDI*, 7, 104-110.
- Clark I.A. and Allison A.C., “Babesia microti, and Plasmodium berghei yoelii infections in nude mice,” *Nature*, vol. 252, no. 5481, pp. 328–329, 1974.
- Clark I. A., Budd A. Alleva L. M., Cowden W. B. Human malarial disease: a consequence of inflammatory cytokine release *Malar J*. 2006; 5: 85. Published online 2006 October 10. doi: 10.1186/1475-2875-5-85.
- de Waal DT. Equine piroplasmiasis: A review. *Br Vet J* 1992;148:6–14.
- de Waal DT. The transovarial transmission of Babesia caballi by Hyalomma truncatum. *Onderstepoort J Vet Res* 1990;57:99–100
- de Waal DT and Van Heerden J (2004). Equine Babesiosis. In du Plessis, I. (Ed.), *Infectious Diseases of Livestock*. Oxford University Press, Cape Town, pp. 425-434.
- de Waal DT, van Heerden J, Potgieter FT. An investigation into the clinical pathological changes and serological response in horses experimentally infected with Babesia equi and Babesia caballi. *Onderstepoort J Vet Res* 1987;54:561–568.

- Di Corinto, G.J., Confini, B., Savini, G., Gatti, A., 2007. Piroplasmosi nei cavalli abruzzesi e marchigiani. *Il Progresso Veterinario* 5, 209–213.
- Donnellan CM, Marais HJ. Equine piroplasmosis. In: Mair TS, Hutchinson RE, eds. *Infectious Diseases of the Horse*. Cambridgeshire, England, UK: EVJ Ltd; 2009:333–340.
- Donnellan C, Page P, Nurton P, van den Berg JS, and Guthrie A (2003b) Piroplasmosis - current trends. Conference Proceedings of the Equine Practitioners Group of South Africa, 86-87.
- Donnelly J, Joyner LP, Graham-Jones O, and Ellis CP (1980) A comparison of the complement fixation and immunofluorescent antibody tests in a survey of the prevalence of *Babesia equi* and *Babesia caballi* in horses in the Sultanate of Oman. *Tropical Animal Health And Production*, 12, 50-60.
- Frerichs WM, Holbrook AA, and Johnson AJ (1969) Equine piroplasmosis: complement-fixation titers of horses infected with *Babesia caballi*. *Am J Vet Res*, 30, 697-702.
- Friedhoff KT, Tenter AM, Muller I. Haemoparasites of equines: Impact on international trade of horses. *Rev Sci Tech* 1990;9:1187–1194.
- Friedhoff KT, Soule C. An account on equine babesioses. *Rev Sci Tech* 1996;15:1191–1201.
- Frerichs WM, Allen PC, Holbrook AA. Equine piroplasmosis (*Babesia equi*): Therapeutic trials of imidocarb dihydrochloride in horses and donkeys. *Vet Rec* 1973;93:73–75.
- Frerichs WM, Holbrook AA. Treatment of equine piroplasmosis (*B. caballi*) with imidocarb dipropionate. *Vet Rec* 1974;95:188–189.
- Frölich S., Entzeroth R., Wallach M. Comparison of Protective Immune Responses to Apicomplexan Parasites *Journal of Parasitology Research* (2011).
- Frost RA, Nystrom GJ, Lang CH. Tumor necrosis factor-alpha decreases insulin-like growth factor-I messenger ribonucleic acid expression in C2C12 myoblasts via a Jun N-terminal kinase pathway. *Endocrinology*. 2003 May;144(5):1770-9.
- Georges KC, Ezeokoli CD, Sparagano O, et al. A case of transplacental transmission of *Theileria equi* in a foal in Trinidad. *Vet Parasitol* 2011;175:363–366.
- Gerstenberg C, Allen WR, Phipps LP. The mechanical transmission of *Babesia equi* infection in a British herd of horses. In: *Proceedings of the Eighth International Conference on Equine Infectious Diseases*. Dubai, United Arab Emirates, 1998:100.

- Grandi G, Molinari G, Tittarelli M, Sasseria D, Kramer LH. Prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infection in horses from northern Italy. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2011 Jul;11(7):955-6.
- Grause JF, Ueti MW, Nelson JT, et al. Efficacy of imidocarb dipropionate in eliminating *Theileria equi* from experimentally infected horses. *Vet J* 2013;196:541–546.
- Guimaraes AM, Lima JD, Ribeiro MF, Camargos ER, and Bozzi IA (1998) Ultrastructure of sporogony in *Babesia equi* in salivary glands of adult female *Boophilus microplus* ticks. *Parasitol Res*, 84, 69-74.
- Gummow B, de Wet CS, and de Waal DT (1996) A sero-epidemiological survey of equine piroplasmiasis in the northern and eastern Cape Provinces of South Africa. *Journal Of The South African Veterinary Association*, 67, 204-208.
- Hailat NQ, Lafi SQ, al-Darraji AM, and al-Ani FK (1997) Equine babesiosis associated with strenuous exercise: clinical and pathological studies in Jordan. *Veterinary Parasitology*, 69, 1-8.
- Heerden Jv (1996) Equine babesiosis in South Africa: a report of two cases. *Equine Veterinary Education*, 8, 3-5.
- Holbrook AA (1969) Biology of equine piroplasmiasis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 155, 453-454.
- Ikadai H, Sasaki M, Ishida H, et al. Molecular evidence of *Babesia equi* transmission in *Haemaphysalis longicornis*. *Am J Trop Med Hyg* 2007;76:694–697.
- Jacobson L. S. and Lobetti R. G. - Rhabdomyolysis as a complication of canine babesiosis *Journal of Small Animal Practice* (1996) 37, 286-291
- Joyner LP, Donnelly J, and Huck RA (1981) Complement fixation tests for equine piroplasmiasis (*Babesia equi* and *B caballi*) performed in the UK during 1976 to 1979. *Equine Veterinary Journal*, 13, 103-106.
- Kumar S, Gupta AK, Pal Y, et al. In-vivo therapeutic efficacy trial with artemisinin derivative, buparvaquone and imidocarb dipropionate against *Babesia equi* infection in donkeys. *J Vet Med Sci* 2003;65:1171–1177.
- Laus F, Veronesi F, Passamonti F, Paggi E, Cerquetella M, Hyatt D, Tessei B, Fioretti DP. Prevalence of Tick Borne Pathogens in Horses from Italy. *J Vet Med Sci.* 2013 Jan 18. [Epub ahead of print]
- Laveran A (1901) Contribution à l'étude du *Piroplasma equi*. *C R Seances Soc Biol Paris* 53: 385±386.
- Leal, Danielle C., Madruga, Cláudio R., Matos, Paulo F. de, Souza, Bárbara M. P. da S., & Franke, Carlos R. (2011). Evaluation of PCR and multiplex

- PCR in relation to nested PCR for diagnosing *Theileria equi*. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 31(7), 575-578.
- Lewis BD, Penzhorn BL, Volkmann DH. Could treatment of pregnant mares prevent abortions due to equine piroplasmiasis? *J S Afr Vet Assoc* 1999;70:90–91.
- Lillini, E., Fagiolo, A., Cavallina, R., Condoleo, R., Piratino, S., Oleandri, M., 1981. Sull'impiego della fissazione del complemento per la diagnosi di babesiosi nei cavalli sportivi e negli equidi allo stato brado. In: *Proceedings of Società Italiana di Ippologia*, Grosseto, Italy, vol. 3. pp. 85–90.
- Madden PA and Holbrook AA (1968) Equine piroplasmiasis: indirect fluorescent antibody test for *Babesia caballi*. *Am J Vet Res*, 29, 117-123.
- Mancianti, F., Nardoni, S., Cecconi, M., Bonanno, L., 2000. Prevalenza di anticorpi anti-babesia in cavalli da corsa della Toscana. *Ippologia* 1, 29–33.
- Maurer FD. Equine piroplasmiasis—Another emerging disease. *J Am Vet Med Assoc* 1962;141:699–702.
- McHardy N, Woollon RM, Clampitt RB, et al. Efficacy, toxicity and metabolism of imidocarb dipropionate in the treatment of *Babesia ovis* infection in sheep. *Res Vet Sci* 1986;41:14–20.
- Meyer C, Guthrie AJ, Stevens KB. Clinical and clinico- pathological changes in 6 healthy ponies following intramuscular administration of multiple doses of imidocarb dipropionate. *J S Afr Vet Assoc* 2005;76:26–32.
- Mehlhorn H and Schein E (1998) Redescription of *Babesia equi* Laveran, 1901 as *Theileria equi* Mehlhorn, Schein 1998. *Parasitol Res*, 84, 467-475.
- Moltmann UG, Mehlhorn H, Schein E, et al. Ultrastructural study on the development of *Babesia equi* (Coccidia: Piroplasmia) in the salivary glands of its vector ticks. *J Protozool* 1983;30:218–225
- Moretti, A., Mangili, V., Salvatori, R., Maresca, C., Scoccia, E., Torina, A., Moretta, I., Gabrielli, S., Tampieri, M.P. and Pietrobelli, M. 2010. Prevalence and diagnosis of *Babesia* and *Theileria* infections in horses in Italy: a preliminary study. *Vet. J.* 184: 346-350.
- Mourkioti F., Kratsios P., Luedde T., Song Y.H., Delafontaine P., Adami R., Parente V., Bottinelli R., Pasparakis M., Rosenthal N. Targeted ablation of IKK2 improves skeletal muscle strength, maintains mass, and promotes regeneration. *J Clin Invest.* 2006 Nov;116(11):2945-54.

- Nagai A, Yokoyama N, Matsuo T, et al. Growth-inhibitory effects of artesunate, pyrimethamine, and pamaquine against *Babesia equi* and *Babesia caballi* in in vitro cultures. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:800–803.
- Nardoni S, Sgorbini M, Gugliucci B, Merildi V, Cammà C, Franceschi A, Corazza M, Mancianti F (2007) Preliminary study on the variation of clinical parasitological features in a group of Amiata donkeys infected by *Theileria equi*. *Parassitologia* 49 (1), 97.
- Nunn J. A., Army Veterinary Department. Reports on African horse-sickness. 1 edition, 1888.
- Nuttall, G.H.F., Strickland, C., 1910. Die Parasiten des Pferdepiroplasmose resp. der 'Bilary fever'. *Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten Abteilung I* 56, 524-525.
- Oladosu LA. Effects of intravenous corticosteroid on the pathogenicity of *Babesia equi* infection of donkeys (*Equus asinus*). *Zentralbl Veterinarmed B* 1988;35:509–514.
- Oladosu LA, Olufemi BE. Haematology of experimental babesiosis and ehrlichiosis in steroid immunosuppressed horses. *Zentralbl Veterinarmed B* 1992;39:345–352.
- Paciello O, Oliva G, Gradoni L, Manna L, Foglia Manzillo V, Wojcik S, Trapani F, Papparella S. Canine inflammatory myopathy associated with *Leishmania Infantum* infection. *Neuromuscul Disord.* 2009 Feb;19(2):124-30. doi: 10.1016/j.nmd.2008.10.013 Epub 2008 Dec 11.
- Phillips T. & Leeuwenburgh C. Muscle fiber-specific apoptosis and TNF- α signaling in sarcopenia are attenuated by life-long calorie restriction. *The FASEB Journal express article* 10.1096/fj.04-2870fje. Published online January 21, 2005.
- Phipps LP, Otter A. Transplacental transmission of *Theileria equi* in two foals born and reared in the United Kingdom. *Vet Rec* 2004;154:406–408.
- Phipps LP (1996) Equine piroplasmosis. *Equine Veterinary Education*, 8, 33-36.
- Pieragostini E, Petazzi F (2000) Genetics and tolerance to tick borne diseases in south Italy: experience in studying native Apulian and exotic sheep breeds. *Parassitologia* 41 (suppl 1), 89-94.
- Poli G., Cocilovo A. *Microbiologia ed Immunologia veterinaria*, UTET, Torino, 1996.

- Posnett ES, Fehrson J, de Waal DT, and Ambrosio RE (1991) Detection of *Babesia equi* in infected horses and carrier animals using a DNA probe. *Vet Parasitol*, 39, 19- 32.
- Rampersad J, Cesar E, Campbell MD, Samlal M, and Ammons D (2003) A field evaluation of PCR for the routine detection of *Babesia equi* in horses. *Vet Parasitol*, 114, 81-87.
- Rashid H, Chaudhry M, Rashid H, et al. Comparative efficacy of diminazene diacetate and diminazene acetate for the treatment of babesiosis in horses. *Trop Anim Health Prod* 2008;40:463–467.
- Ribeiro MF, Costa JO, and Guimaraes AM (1999) Epidemiological aspects of *Babesia equi* in horses in Minas Gerais, Brazil. *Veterinary Research Communications*, 23, 385- 390.
- Savini, G., Battistini, M.L., Scaramozzino, P., Tittarelli, M., Molteni, C., 1997. Le babesiosi equine – La situazione italiana. *Summa*, 35–40.
- Scala A, Polinas L, Marras A, Nieddu MS, Varcasia A, Garippa G (2006) Le babesiosi equine in Sardegna: rilievi siero epidemiologici. *SISVet*, 127-128.
- Schwint ON, Ueti MW, Palmer GH, et al. Imidocarb dipropionate clears persistent *Babesia caballi* infection with elimination of transmission potential. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:4327–4332.
- Schein E. Equine babesiosis. In: Ristic M (ed) *Babesiosis of domestic animals and man*. CRC, Boca Raton 1988.
- Schwint ON, Ueti MW, Palmer GH, et al. Imidocarb dipropionate clears persistent *Babesia caballi* infection with elimination of transmission potential. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:4327–4332.
- Scoles, G., Ueti, M.W., 2015. Vector ecology of equine piroplasmiasis. *Annu. Rev. Entomol.* 60, 561–580, <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-021110>.
- Semproni, G., Turilli, C., Toraldo, B., Ferrari, A., 1987. Indagine sierologica nei confronti di *Babesia equi* e *Babesia caballi* in cavalli di alcune regioni italiane. *Proceedings of XLI National Congress of S.I.S.Vet.*, Copanello, Italy, vol. 41. pp. 1138–1141.
- Short MA, Clark CK, Harvey JW, et al. Outbreak of equine piroplasmiasis in Florida. *J Am Vet Med Assoc* 2012;240:588–595.
- Silvey RE. Babesiosis in a foal. *Vet Rec* 1996;139:428.
- Smith T, Kilborne FL. Investigation into the nature, causation, and prevention of southern cattle fever. *US Dept Agr Bur Anim Indust Bull* 1893; 1:1-301.

- Sobrero, L.E. and Manilla, G. 1988. Aggiornamenti sulle zecche d'Italia: loro distribuzione e sistema. *I.G.M. Bonifica* 4: 1-111.
- Tenter AM and Friedhoff KT (1986) Serodiagnosis of experimental and natural *Babesia equi* and *B. caballi* infections. *Veterinary Parasitology*, 20, 49-61.
- Tsujinaka T, Fujita J, Ebisui C, Yano M, Kominami E, Suzuki K, Tanaka K, Katsume A, Ohsugi Y, Shiozaki H, Monden M. Interleukin 6 receptor antibody inhibits muscle atrophy and modulates proteolytic systems in interleukin 6 transgenic mice. *J Clin Invest*. 1996 Jan 1;97(1):244-9.
- Ueti MW, Mealey RH, Kappmeyer LS, et al. Re-emergence of the apicomplexan *Theileria equi* in the United States: Elimination of persistent infection and transmission risk. *PLoS One* 2012;7:e44713.
- Ueti MW, Palmer GH, Scoles GA, et al. Persistently infected horses are reservoirs for intrastadial tick-borne transmission of the apicomplexan parasite *Babesia equi*. *Infect Immun* 2008;76:3525–3529.
- Uilenberg G (2006) *Babesia*-A historical overview. *Vet Parasitol*.
- Veronesi, F., Laus, F., Moretta, I., Piergili Fioretti, D., Spaterna, A., Tesi, B. and Moretti, A. 2010. Prevalenza di *Babesia caballi* e *Theileria equi* in cavalli di razza tolfetana. *Ippologia* 21: 3-9.
- Vial H.J. and Gorenflot A. Chemotherapy against babesiosis. 2006 *Vet Parasitol*.
- Weiland G (1986) Species-specific serodiagnosis of equine piroplasma infections by means of complement fixation test (CFT), immunofluorescence (IIF), and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Veterinary Parasitology*, 20, 43-48.
- Wise LN, Ueti MW, Kappmeyer LS, et al. In vitro activity of ponazuril against *Theileria equi*. *Vet Parasitol* 2012;185:282–285.
- World Animal Health Information Database (WAHID). Available at: http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseasesdistributionmap?disease_type_hidden=&disease_id_hidden=&selected_disease_name_hidden=&disease_type=0&disease_id_terrestrial=61&species_t=0&disease_id_aquatic=_999&species_a=0&sta_method=monthly&selected_start_year=2016&selected_report_period=1&selected_start_month=1&date_submit=OK. Accessed September 30, 2018.
- Xu Y, Zhang S, Huang X, Bayin C, Xuan X, Igarashi I, Fujisaki K, Kabeya H, Maruyama S, and Mikami T (2003) Seroepidemiologic studies on *Babesia equi* and *Babesia caballi* infections in horses in Jilin province of China. *J Vet Med Sci*, 65, 1015-1017.

- Yong, Kok Pin; Tan, Ban Hock; Low, Chian Yong Severe falciparum malaria with dengue coinfection complicated by rhabdomyolysis and acute kidney injury: an unusual case with myoglobinemia, myoglobinuria but normal serum creatine kinase. *BMC infectious diseases*, 2012, 12.1: 364.
- Young A., Linehan E., Hams E., O'Hara Hall A.C., McClurg A., Johnston J.A., Hunter C.A., Fallon P.G., Fitzgerald D.C. Cutting edge: suppression of GM-CSF expression in murine and human T cells by IL-27. *J Immunol.* 2012 Sep 1;189(5):2079-83.
- Zaugg JL, Lane VM. Evaluations of buparvaquone as a treatment for equine babesiosis (*Babesia equi*). *Am J Vet Res* 1989;50:782–785.
- Zintl A., Mulcahy G., Skerrett H. E., Taylor S. M., Gray J. S. *Babesia divergens*, a Bovine Blood Parasite of Veterinary and Zoonotic Importance. *Clin Microbiol Rev.* 2003 October; 16(4): 622–636. doi: 10.1128/CMR.16.4.622-636.2003.
- Zobba R, Ardu M, Niccolini S, et al. Clinical and laboratory findings in equine piroplasmiasis. *J Eq Vet Sci* 2008;28:301– 308.

Chapter 4

Performances evaluation in Italian Standardbred horses
PCR-positive to *Theileria equi*

4.1 Introduction

Equine Piroplasmosis (EP) is an infectious tick-borne disease, affecting different species of equids, caused by the intra-erythrocytic protozoa *Theileria equi* and *Babesia caballi*. Even if data are still lacking, in many Italian regions EP can be considered endemic and high rates of seropositive animals are reported (Bartolomé Del Pino et al., 2016; Laus et al., 2013; Grandi et al., 2011; Moretti et al., 2010).

It was stated that seropositive racehorses can show decrease in performance if compared with seronegative ones and the stress due to intense athletic activity can lead them to develop a clinically manifest pathology (Hailat et al., 1997; Wise et al., 2013). However, there are few bibliographical references concerning the poor performance syndrome in trotters and even less those referring to IS (De Waal, 1992; Friedhoff and Soulé, 1996; Couroucé-Malblanc et al., 2006; Wise et al. 2013).

The failure of horses to meet reasonable and achievable performances expectation is considered as poor performance. The most frequent causes of poor performances are attributable to musculo-skeletal and respiratory problems (Dabbene et al., 2018, Martin et al., 2000; Morris and Seeherman, 1991). Myopathies, subtle muscle pain and weakness can also negatively impact performance (Valberg, 2018).

Causes of inflammatory myopathy in horses include bacterial infections, parasitic infections and immune-mediated conditions (Aleman, 2018; Durward-Akhurst et al., 2016; Lewis et al., 2007). The presence of an inflammatory myopathy has been reported in the dog affected by *Babesia canis* (Jacobson and Lobetti, 1996) and during malaria infection in men (Swash and Schwartz 1993). An inflammatory myopathy has been recently described in horses with chronic EP, in which muscle damage would result from the development of autoantibodies against muscle antigens (Pasolini et al., 2018).

The aims of this study were: 1. to evaluate the prevalence of PCR positivity to *Theileria equi* and *Babesia caballi* in clinically healthy Italian Standardbred (IS) race horses; 2. to compare the performances of PCR positive and negative horses; 3. if performances actually differ, to investigate the possible causes and specifically if the inflammatory myopathy is a cause of poor performance in PCR positive horses.

Our hypotheses were: 1. the haematology and serum biochemistry parameters and performances of clinically healthy PCR positive IS do not differ by negative ones; 2. the presence/absence of inflammatory myopathy in PCR positive IS could be a cause of lower performances.

4.2 Materials and Methods

The study included 130 IS horses, 45 females, 85 males. All horses of both sexes, aged from 3 to 11 years, that were in full training and ready to compete from 7 stables in the Campania region (Southern Italy) were sampled. The subjects that in the last 6 months had orthopedic, respiratory or cardiovascular diseases or that shows clinical signs at the physical examination were ruled out.

All horses that experienced a change of trainer/driver or owner were excluded as well. At the blood sampling, a survey was performed noting signalment, anamnestic and management data of the horse, particularly: name, age, gender and coat, as shown in fig. 4.1.

Body weight in kilograms was assessed using the formula developed by Carroll and Huntington (1988), based on the heart girth and body length measurements in centimetres:

$$\text{Body weight (kg)} = \frac{\text{girth}^2 \times \text{lenght (cm)}}{11877}$$

The presence/absence of muscle atrophy was scored evaluating the development of the muscles of the croup and thigh with a scale from 0 to 3, where 0 indicated the absence of atrophy, 1 mild, 2 moderate and 3 severe atrophy. The evaluation was always subjectively performed by the same operator.

To assess the performances, mean of times of the last kilometre (m/s), best time, number of starts, number of victories, number of placements, mean of earnings and total earnings in last 30 races prior to blood sampling were recorded.

Performances evaluation in Italian Standardbred horses
PCR-positive to *Theileria equi*



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II

DEPARTMENT OF VETERINARY MEDICINE AND ANIMAL PRODUCTION

SURGERY SECTION

HORSE			
Name			
Age			
Sex	M <input type="checkbox"/>	F <input type="checkbox"/>	G <input type="checkbox"/>
Coat	Notes:		
Measurements	Circumference:	Length:	Weight:
Change propriety	Yes <input type="checkbox"/> (last 3 months)	No <input type="checkbox"/>	
Change trainer	Yes <input type="checkbox"/> (last 3 months)	No <input type="checkbox"/>	
Change driver	Yes <input type="checkbox"/> (last 3 months)	No <input type="checkbox"/>	
Previous diseases	Respiratory <input type="checkbox"/>	Musculoskeletal <input type="checkbox"/>	Others <input type="checkbox"/> :
Physical examination	Normal <input type="checkbox"/>	Abnormal <input type="checkbox"/> :	
Respiratory tract examination	Normal <input type="checkbox"/>	Abnormal <input type="checkbox"/>	Others <input type="checkbox"/> :
Gait analysis	Normal <input type="checkbox"/>	Lameness <input type="checkbox"/>	RF /5 LF /5 RH /5 LH /5
Muscular atrophy*	Absent <input type="checkbox"/>	Mild <input type="checkbox"/>	Moderate <input type="checkbox"/> Severe <input type="checkbox"/>
Administered drugs			

* No atrophy: convexity of the thigh and gluteal region
Mild atrophy: reduction of muscle mass, bony prominences detectable at palpation
Moderate atrophy: slightly evident bony prominences
Severe atrophy: bony prominences easily visible on inspection

Fig. 4.1 Model for data collection

All procedures on the horses were carried out as part of routinely clinical evaluation and with the owner's consent in accordance with the Guiding Principles in the Care and Use of Animals approved by Italian laws and were approved by the University ethics commission.

4.2.1 Blood collection

Blood sampling were performed by qualified veterinarians at 7.00 to 8.00 a.m., the morning after a day of rest, before the daily training. Blood samples

from the jugular veins were collected into vacuum tubes (Vacutainers; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), in the period between november 2016 and september 2018. Two samples with EDTA were collected for complete blood count (CBC) and PCR for *T. equi* and *B. caballi*. Two samples without anticoagulant were collected for serum biochemistry. Samples for CBC and Serum Biochemistry were sent to the laboratory on ice packs within 2 hours from collection, immediately centrifuged, and processed. Samples for PCR evaluation were sent refrigerated to IZSLT (Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana - Rome, Italy) laboratory within 36 hours from the collection.

4.2.2 Hematology and Serum Biochemistry

CBC was performed using a cell counter analyzer (HeCo Vet 5; Seac, Firenze, Italy), and a complete biochemical profile (urea, creatinine, bilirubin, BUN-to-creatinine ratio [BUN/crea], glucose, ionized calcium, aspartate aminotransferase [AST], Alkaline Phosphatase [ALKP], lactate dehydrogenase [LDH], creatine kinase [CK], g-glutamyltranspeptidase [GGT], total proteins, albumin, albumin-globulin ratio, globulin) was performed using a Catalyst DxTM Chemistry Analyzer (IDEXX, Westbrook, Maine).

4.2.3 Molecular tests

Real Time PCR (rtPCR) were performed following the protocols described by Kim et al. (2008) and by Bartolomè Del Pino et al. (2016) for *T. equi* and *B. caballi*.

4.2.3.1 DNA extraction

DNA blood extraction was performed using the automated robotic workstation QIAcube HT (Qiagen, GmbH, Hilden, Germany) and the QIAamp cador Pathogen Mini kit (Qiagen) according to the manufacturers instructions. The DNA was eluted in 150 µl AVE buffer included in the kit, composed of RNAase-free water containing 0,04% NaN₃ and stored at -80 °C.

4.2.3.2 Real time PCR for *B. caballi* and *T. equi*

RtPCR for *T. equi* amplified an 81 bp fragment outside the V4 hypervariable region of the 18S rRNA gene. Primers (F:Be18SF; R:Be18SR) and TaqMan probe (VIC-TAMRA, Be 18SP) were those reported by Kim et al. (2008). RtPCR for *B. caballi* amplified a 95 bp fragment in the V4 hypervariable region of the 18S rRNA gene of *B. caballi*. Primers (F: Bc-18SF402; R: Bc-18SR496) and TaqMan MGBTM probe (FAM-MGB, Bc-18SP) were those reported by Bhoora et al., (2010). For both rtPCRs, TaqMan® Universal PCR Master Mix kit (A. Biosystems, Foster City, CA, USA) was used. Internal positive controls were rtPCR products of *B. caballi* and *T. equi*, obtained from EDTA blood samples of seropositive symptomatic subjects, certified by the Office International des Epizooties (OIE) Reference Laboratory for Babesiosis of the Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, and cloned in the plasmid vector PCRII®-TOPO® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The negative control used in the reactions was RNAase-free water.

The rtPCRs were carried out using ABIPRISM 7900 HT Sequence Detection System (A. Biosystems).

4.2.3.3 Sequencing

The specificity of the rtPCR results was verified by sequencing the amplicons of some of the PCR positive samples (44) obtained using a nested PCR protocol as described by Nagore et al. (2004), amplifying the hypervariable V4 region of the 18 rRNA gene of both protozoa. The amplicons were sequenced using an automated sequencer (3500 Genetic Analyzer, A. Biosystems, Foster City, CA, USA) and the nucleotide sequences obtained were analysed using the Genetic Analyzer Sequencing v5.4 (A. Biosystems, Foster City, CA, USA). Sequence identity was verified using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) and by comparing those obtained with *T. equi* sequences present in NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Sequences presenting an identity and query coverage $\geq 98\%$ were considered as homologous to those deposited in GenBank for the two piroplasms (Marasca et al., 2005).

4.2.4 Performances evaluation

The data of the 30 racing days preceding the blood collection were obtained from the official racing website (Ippica Biz by IPPICA E STAMPA srl, <http://www.ippicabiz.it>). The data collected were used to obtain: best time in the 30 races preceding the blood draw, number of placed races, time record, victories, mean racing speed during races and earnings (Hoppe 1984; Alvarado et al. 1989; Hardy et al. 1991; Laws et al. 1993; Beard et al. 1994; Grondhal et al. 1994; Grondhal and Engeland 1995; Storgaard Jorgensen et al. 1997; Brehm and Staecker 1999; Torre, 1999). Racing speed was the average speed maintained by the horse over the last 1000 m of a race (m/s).

4.2.5 Statistical Analysis

All data were imported into programs for statistical analysis (GraphPad Prism 6.0c, GraphPad Software, San Diego, CA; JMP 14.0; SAS Institute, Cary, NC). The level of significance was set at $P \leq 0.05$. Normal distribution was tested by the Shapiro-Wilk's W test. The sample size was calculated *a priori* using G*power[®] 3.1 software with an effect size of 0.5 (according to Cohen, 1988).

A multivariate General Linear Model (GLM) was used: 1. to evaluate the effect of signalment data (age, gender and body weight) and performances either on PCR positive or negative horses; 2. to evaluate the effect of management, PCR and their interaction (PCR x Stable) on the muscle atrophy score; 3. to examine any association existing between signalment data, PCR results, performances, muscle atrophy, haematological and serum biochemistry values. Whenever an effect resulted significant, it was further analysed by Mann-Whitney's U test or Student's t test, for dichotomous comparisons (i.e., PCR positive vs. PCR negative); when applying the Student's t test, the Levene's test was used to evaluate the variance between groups. One-way analysis of variance (ANOVA) or a Kruskal-Wallis test was applied when the comparison was between more than two levels (i.e., mild vs. moderate vs. absent muscle atrophy), according to distribution. *Post hoc*, a Tukey's honest significant difference (*HSD*) test or a Dunn's test for multiple comparisons was applied, accordingly. The correlation between PCR results and gender was tested by a Fisher's F exact test; percentages of the frequency distribution were reported, with 95% confidence intervals (CI95%). For the haematological and serum biochemistry parameters

influenced by age and/or body weight, the correlations were calculated using the Pearson's product moment test (r) or the Spearman's rank correlation test (r_s), depending on the data distribution.

4.3 Results

4.3.1 PCR results

A sample of 130 horses will ensure that a two-sided test with $P=0.05$ has 80% power to detect a difference between positives and negatives (fig 4.2).

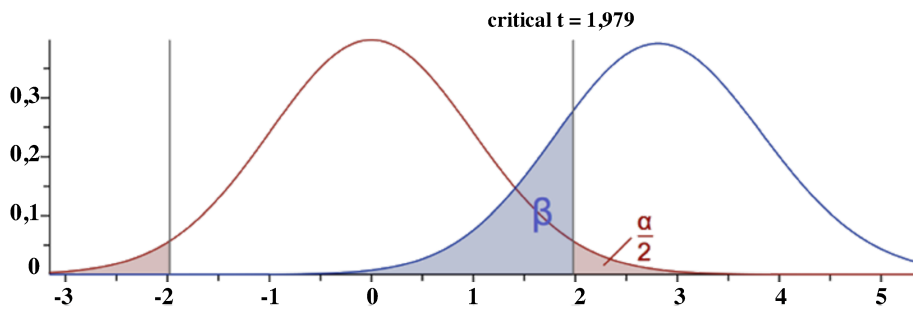


Fig. 4.2 Power estimation and sample size determination

The exclusion criteria led to an actual sample of 124 horses. For the reasons just mentioned, 124 IS, 43 females and 81 males, aged from 3 to 11 years (median and range: 5, 3-11) were enrolled in the study. All the IS of both sexes were PCR negative to *B. caballi*, whereas 45 horses were positive to *T. equi* (36,3%) (CI 95%) (Pos group) and 79 (63,7%) were negative (Neg group). In Pos group, 37 were males (45,7%; 35-57) and 8 females (18,6%; 8-33); in Neg group, 44 were males (54,3%; 43-65) and 35 females (81,4%; 67-92) (tab. 4.1).

The general linear model (GLM) testing the effects of signalment data (age, sex and body weight) related to the positivity/negativity to PCR showed a highly positivity ($P=0.0067$). In particular, age ($P=0.0089$) and gender

($P=0.0487$) had significant effects. The results of the Fisher's exact test showed that females were more resistant than males (Fig. 4.3).

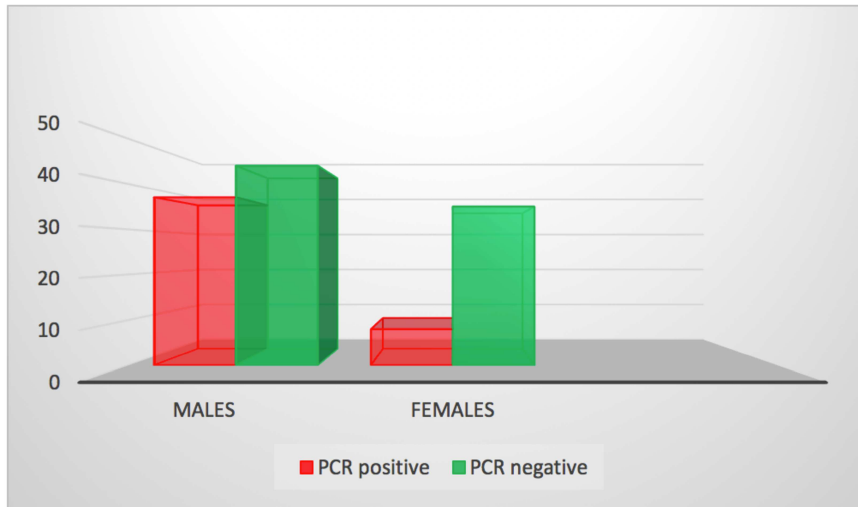


Fig. 4.3 Prevalence of *T. equi* Pos and Neg groups

The Pos group age (6; 3-11) was significantly higher ($P=0.0075$) than in the Neg group age (4; 3-10).

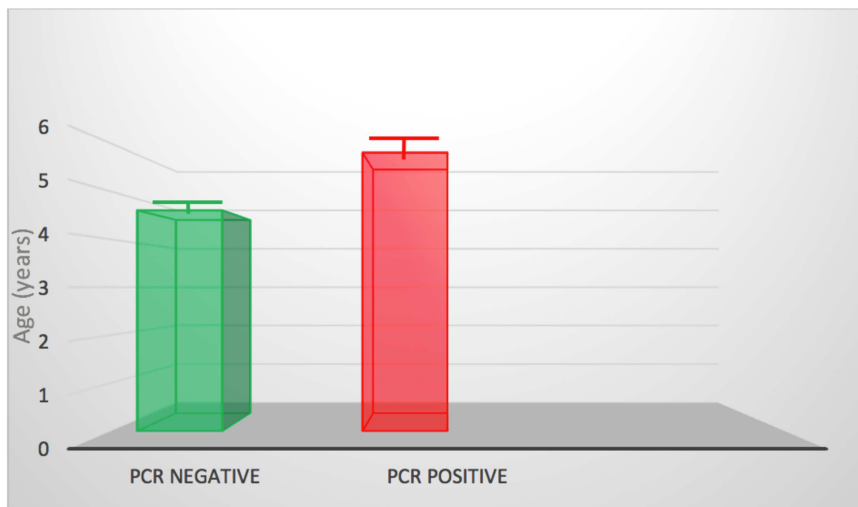


Fig. 4.4 Age and positivity to *T. equi*

4.3.2 Performances

All performance parameters did not differ either between Pos and Neg groups (tab. 4.2) or between genders.

Studying the effect of age into the Pos and Neg groups, there were not significant differences in mean and total earnings and in the number of victories. The age influenced the best times only in Neg group ($P=0.0009$), the mean of times (Neg group: $P=0.0008$; Pos group: $P=0.02$) and the numbers of starts (Neg and Pos groups: $P<0.0001$) and placements (Neg and Pos groups: $P=0.001$) in both groups.

4.3.3 Muscle atrophy

Severe atrophy was not observed in any horse.

There was not difference between muscle atrophy scores of Pos and Neg groups (tab. 4.1). The GLM model testing the effect on muscle atrophy of PCR positivity/negativity, stable effect and combined PCR with stable effect was highly significant ($P=0.0063$). The same GLM model inside each group, demonstrated a significant effect of the stable on the atrophy in Neg group ($P=0.001$) (Fig.4.5), but not in Pos group ($P=0.14$).

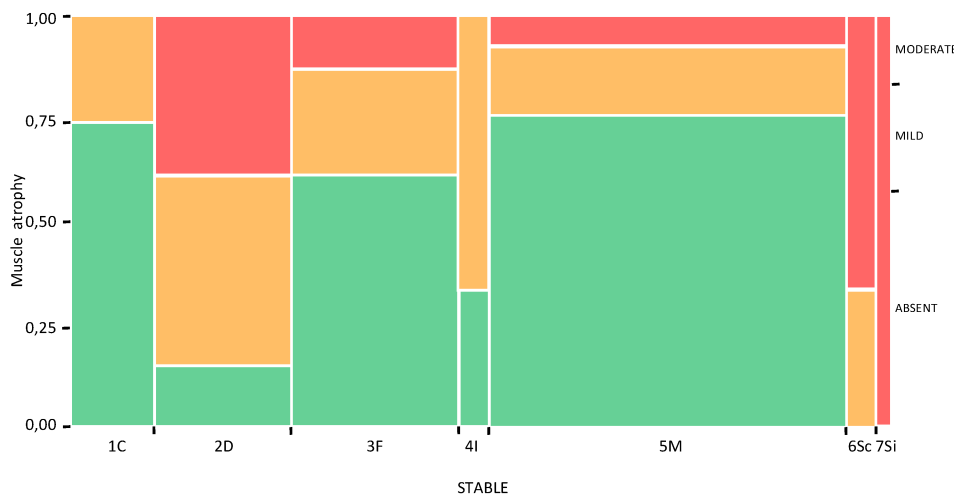


Fig. 4.5 Effect of the stable on the muscle atrophy in Neg group ($P=0.001$)

Variable	PCR POSITIVE (36.3%)						PCR NEGATIVE (63.7%)						P values
	Absent	Mild	Moderate	Severe	Absent	Mild	Moderate	Severe	Absent	Mild	Moderate	Severe	
SEX	M 37 (45.7%) F 8 (18.6%)						M 44 (54.3%) F 35 (81.4%)						0,0032
AGE	6 (4-8)						4 (3-5)						0,0075
BODY WEIGHT	441 (405 - 469)						436,5 (413.25 - 465.5)						0.81
ATROPHY	Absent	Mild	Moderate	Severe	Absent	Mild	Moderate	Severe	Absent	Mild	Moderate	Severe	0.80
	24 (29.6%)	9 (11.1%)	4 (4.9%)	0 (0%)	3 (7%)	3 (7%)	2 (4.6)	0 (0%)	29 (35.8%)	8 (9.9%)	7 (8.6%)	0 (0%)	

Tab. 4.1 Signalment data and atrophy scores in Pos and Neg groups

Variable	PCR POSITIVE	PCR NEGATIVE
NUMBER OF STARTS	30 (25 - 30)	30 (20.5 - 30)
PLACED RACES	16 (13 - 20)	17 (12 - 21)
VICTORIES	4 (2 - 7)	5 (2 - 8)
SPEED/KM (m/s)	13.28 (13.14 - 13.42)	13.24 (13.13 - 13.36)
BEST TIME (m/s)	13.64 (13.51 - 13.79)	13.60 (13.44 - 13.71)
MEAN EARNINGS (€)	1076.8 (556.1 - 1557.6)	987.5 (679.2 - 1731.5)
TOTAL EARNINGS (€)	22028 (12220 - 42090)	22676 (12954 - 37896)

Tab. 4.2 Performances mean values in Pos and Neg groups

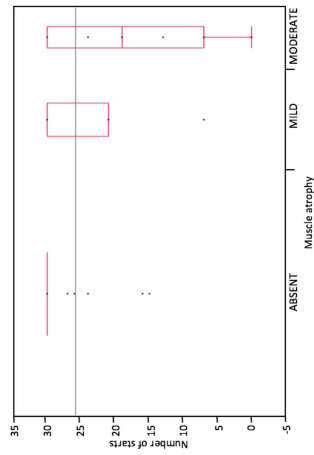


Fig 4.6 a Atrophy score and number of starts in Pos group horses ($P=0.001$)

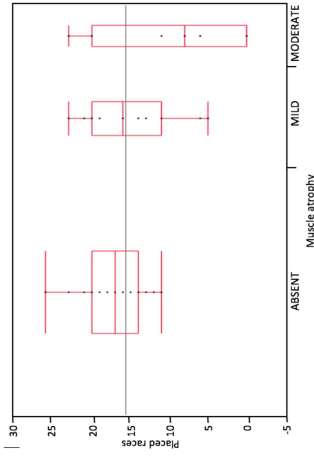


Fig 4.6 b Atrophy score and placed races in Pos group horses ($P=0.0022$)

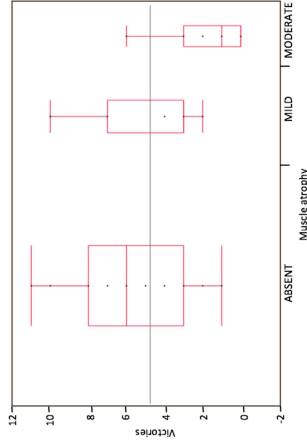


Fig 4.6 c Atrophy score and victories in Pos group horses ($P=0.0043$)

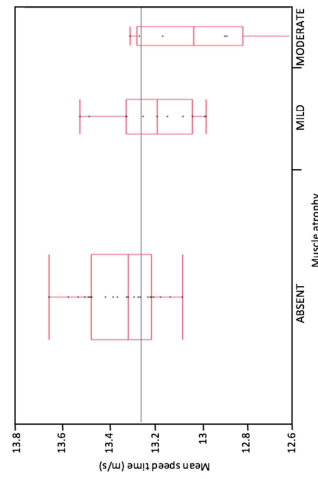


Fig 4.6 d Atrophy score and mean racing speed in Pos group horses ($P=0.0043$)

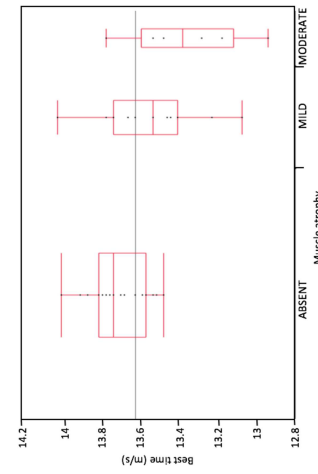


Fig 4.6 e Atrophy score and best time in Pos group horses ($P=0.0009$)

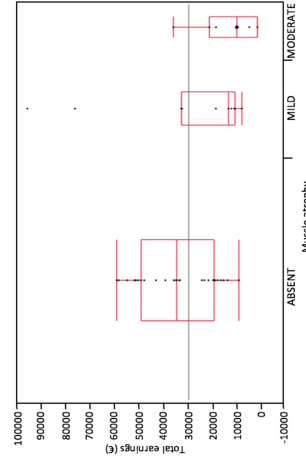


Fig 4.6 f Atrophy score and total earnings in Pos group horses ($P=0.043$)

Performance parameters did not differ with atrophy scores. However, inside the Pos group, some performance parameters were significantly better in horses with lower atrophy scores, whereas there were not significant differences in Neg group.

Particularly, into Pos group, the number of starts ($P=0.0022$), number of placed races ($P=0.0043$), victories ($P=0.0043$), mean racing speed in the last kilometre ($P=0.0009$), best time ($P=0.0005$) and total earnings ($P=0.043$) were significantly better in horses with absent or mild atrophy compared to horses with moderate degree. Only the earnings mean was not atrophy degree-related in positive horses ($P=0.18$) (Fig. 4.6a-f).

4.3.4 Haematology and serum biochemistry parameters

Mean haematological and biochemistry values are reported in tab. 4.3.

PCR negatives horses (142.6 ± 34.8) showed a higher serum ALKP activity than positive ones (117.1 ± 30.2) ($P=0.0001$).

There were not other significant differences of haematological and biochemistry values between Pos and Neg groups, except for a trend observed in Hgb concentrations ($P=0.02$; Neg: 15.3 ± 1.9 - Pos: 14.5 ± 2.2).

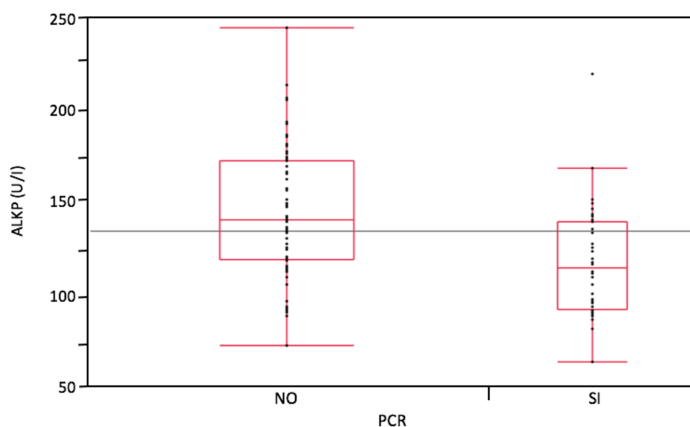


Fig. 4.7a PCR positivity/negativity and ALKP activity ($P=0.0001$)

Performances evaluation in Italian Standardbred horses
PCR-positive to *Theileria equi*

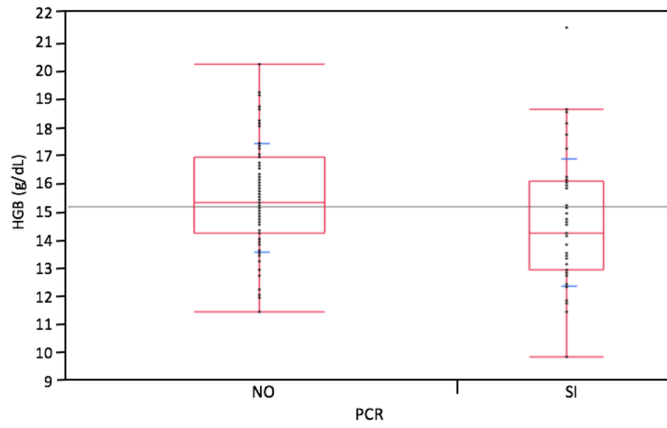


Fig. 4.7b PCR positivity/negativity and HGB concentration ($P=0.02$)

Performances evaluation in Italian Standardbred horses
PCR-positive to *Theileria equi*

Variable	PCR POSITIVE	PCR NEGATIVE
BUN (mg/dl)	17 (10 - 27)	15 (8 - 24)
TBIL (mg/dl)	2.5 (1.5 - 5.4)	2.4 (1.0 - 4.2)
CREA (mg/dl)	1.3 (1.0 - 1.8)	1.3 (0.8 - 2.0)
BUN/CREA	12 (8 - 20)	11 (6 - 18)
GLU (mg/dl)	86 (56 - 140)	84 (52 - 140)
TP (g/dl)	6.5 (6.0 - 8.8)	6.5 (4.4 - 8.6)
ALB (g/dl)	2.8 (2.5 - 3.6)	2.8 (1.8 - 3.4)
GLOB (g/dl)	3.8 (2.7 - 5.5)	3.6 (2.6 - 5.2)
A/G	0.7 (0.6 - 1.3)	0.8 (0.6 - 1.0)
CA (mg/dl)	11.8 (10.9 - 15.3)	11.9 (8.2 - 16.0)
AST (U/l)	344 (171 - 1083)	371 (211 - 1083)
ALKP (U/l)	114 (63 - 219)	140 (72 - 244)
GGT (U/l)	22 (5 - 109)	26 (9 - 98)
CK (U/l)	117 (68 - 215)	118 (10-1885)
LDH (U/l)	735 (256 - 1529)	371 (345 - 1823)
RBC (M/ μ l)	8 \pm 0.8	9 \pm 0.7
HGB (g/dl)	14 \pm 2.2	15 \pm 1.9
HCT (%)	39 \pm 4.4	40 \pm 3.2
MCV (fl)	46.0 (39.4 - 51.0)	45 (40 - 53)
MCH (Pg)	17 \pm 1.9	18 \pm 1.6
MCHC (g/dl)	35.4 (33.7 - 45.8)	39.7 (33.6 - 47.9)
RDW (%)	17.6 (16.4 - 24.1)	17.9 (16.1 - 19.2)
PLT (K/ μ l)	140 (62 - 278)	144 (72 - 254)
MPV (fl)	8.2 (4.7 - 21.3)	8.0 (4.6 - 21.3)
PCT (%)	0,122 (0,061 - 0.401)	0.117 (0.047 - 0.451)
PDW (%)	10.1 (9.5 - 11.9)	10.1 (9.6 - 11.8)
WBC (K/ μ l)	8 \pm 1.5	8 \pm 1.4

Tab. 4.3 Mean haematology and serum biochemistry values

Values of BUN ($r_s=0.42$; $P<0.0001$), CREA ($r_s=0.33$; $P=0.0002$) and GLOB ($r_s=0.24$; $P=0.0088$) increase with increasing age. A trend also for TP ($r_s=0.18$; $P=0.055$) and Hct ($r_s=0.19$; $P=0.037$) was found. Negative correlation was found between age and ALB/GLOB ratio ($r_s= -0.30$; $P=0.001$), ALKP ($r_s= -0.054$; $P=<0.0001$) and LDH values ($r_s= -0.31$; $P=0.0007$) with a trend also for GGT ($r_s= -0.2517$; $P=0.062$).

Males had significant higher TP and GLOB levels than females. A trend was found also for glucose values. Mares, on the other hand, had higher ALB/GLOB ratio, AST, LDH and WBCs values if compared to males (tab. 4.4).

Variable	MALES	FEMALES	P values
GLU (mg/dl)	88.2 ± 17.2	82.3 ± 12.9	0.08
TP (g/dl)	6.7 ± 0.6	6.4 ± 0.5	0.04
GLOB (g/dl)	3.8 ± 0.5	3.6 ± 0.4	0.005
A/G	0.76 ± 0.11	0.81 ± 0.10	0.005
AST (U/l)	391.7 ± 20.1	514.7 ± 39.6	0.0004
LDH (U/l)	713.8 ± 27.1	885.3 ± 55.8	0.01
WBC (K/ μ l)	8.0 ± 1.5	8.6 ± 1.3	0.055

Tab. 4.4 Age-related variation in haematology and serum biochemistry parameters

A significant negative correlation was found between body weight and ALKP ($r_s= -0.18$; $P=0.049$), PLT ($r_s= -0.20$; $P=0.02$), WBCs ($r_s= -0.25$; $P=0.006$) values. A trend was found also for RBCs value ($r= -0.19$ $P=0.038$) and Hct percentage ($r=-0.22$ $P=0.01$).

Values of CREA ($P=0.01$) and BUN/CREA ratio ($P=0.004$) differed in horses with different scores of atrophy. Higher levels of Crea were registered in IS with absent atrophy compared to mild ($P=0.02$). For BUN/CREA ratio, IS with atrophy absent showed lower values compared both to mild ($P=0.029$) and moderate ($P=0.032$).

A borderline significant trend was found for Hgb and PLT values ($P=0.05$ for both). Horses without muscle atrophy had higher Hgb values (15.4 ± 1.9) than moderate atrophy group (14.2 ± 2.2) ($P=0.052$). The number of PLTs was higher in moderate atrophy (166 ± 52) than in absence of atrophy (142 ± 31) ($P=0.04$).

A trend towards significance has been found also for BUN ($P=0.08$). The variability within atrophy scores was $P=0.02$ with a higher concentration in moderate atrophy than in absent one ($P=0.01$) and a trend with mild ($P=0.07$).

4.4 Discussion

This study evaluated the occurrence of *T. equi* in athletic horses insistent on the Italian territory, their performances expressed during the chronic phase of infection, the presence of muscle atrophy evident at the clinical examination and the changes of the haematology and serum biochemistry values.

Although many studies have been published regarding the epidemiology and distribution of EP within specific countries and regions, their results, are often contrasting given the profound variation in experimental design, sample population, and diagnostic testing (Wise et al., 2013). All the horses in our sample were negative to *B. caballi*, in contrast with the occurrence reported in literature in Southern Italy (Bartolomé Del Pino et al., 2018). Sample population in the present study consisted in clinically healthy race horses ready to compete with an excellent immune status and it was stated that a strong and healthy immune system is able to control *B. caballi* (Wise et al., 2013).

Similarly, the percentage of 36.3% for PCR positivity to *T. Equi* obtained in our study deviates from what found by Bartolomé et al. (2018) (70,3%) in Southern Italy, despite the same PCR protocol was used. However, the type of horses examined by Bartolomé et al. (2018) was not specified so we can assume that they tested a mixed population. Our study, on the other hand, included horses careful monitored, housed in boxes and not grazing. Furthermore, the highest prevalence was evident in the inland provinces while our sample was collected mostly in the coastal ones. It has been shown that exposure to vectors due to the geographic area, altitude and farming condition were associated with the presence of the infection (Santos et al.,

2011). Our results are similar to those from a study conducted in Italy by Grandi et al. (2011), which found a positive percentage of 33%. The latter author, on the other hand, employs a different PCRs (End point vs Real time) and target choice (type and length), that are factors influencing the sensitivity of the method.

Age and gender were the most significant signalment data that affect the prevalence in the present study. In literature there is disagreement about their effect on the occurrence of the infection. The percentage of positivity increases in this study when males are distinguished from females (45.7% for males and 18.6% for females). Even if males were overrepresented than females, the statistical analysis confirmed the different occurrence between genders and mares showed a higher resistency to *T. equi* infection than males. In 1996, Gummow et al. showed a seroprevalence significantly higher in males to *B. caballi*, but not to *T. equi*. Females showed a higher prevalence than males in a sample of 673 horses from Southern Italy (Bartolomé Del Pino et al. 2016). In this case, as said above, there were not indication about the breed and the management of the tested horses.

The confirmation, in our study, of a PCR-positivity statistically higher in older horses is in contrast with Bartolomé del Pino et al.(2016), that describe an odds ratio decreasing with age, but it is in agree with a previous study carried out in Mongolia, that highlighted a cumulative age-dependent increase of this result (Rüegg et al., 2008). These dissimilarities could be related to the longer exposure time to the infesting agents or to various management practices. Some authors hypothesised that differences in susceptibility could be breed dependent (Steinman et al., 2012, Sevinc et al., 2008). Mixed breeds are usually more robust while local breeds are more adapted to their environment. The genetic diversity of the the major histocompatibility complex in donkeys, related to EP resistance, is associated with the effects of breeding and different genetic origins of the studied populations rather than a selection driven by the pathogen (Vranova et al., 2011).

Performance objective evaluation is still a subject of considerable research and there are many individuals, occasional or environment-related variables wich can affect performances (Casey, 2007). The evaluation of a single variable regarding the performance may introduce a bias. For example, total earnings can reflect the horse's physical aptitude, but are also partly a function of the opportunities that a horse has to earn depending on the choices made by trainer or owner; the number of placed races reflect the

animal's relative performance and could be, in some measure, a function of the number of starts and level of competition. According to Beard et al. (1994), number of starts may be a good indication of racing longevity, but this variable may also be modified as some trainers may run a bad performer very often in case it could perform well. This is why, in this study, various criteria for racing performance have been chosen as suggested by Couroucé-Malblanc et al. (2006) and Dabbene et al. (2018).

The objective variables considered in the 30 races preceding the blood draw were: number of starts, number of placed races, victories, mean racing speed in the last kilometre (m/s), best time, mean and total earnings.

In our study, the gender never showed an influence on performances even if earlier analyses reported that stallions have better racing performance, as measured by earnings (Langlois, 1975). The same was for riding horses (dressage and show jumping) (Koenen and Aldridge, 2002; Rovere et al., 2016). In the 70s, Standardbred males held advantages over females in best times (Rönningen, 1975), mean racing speed (Katona and Osterkorn, 1977) and money won per year (Rönningen, 1975). Also, males were superior to females in percentage of races won and money won per start (Rönningen, 1975). Despite previous studies were carried out on trotters, differences in management, training and breeding techniques for forty years now have changed. In human athletes, the gender leadership gap did not narrow and the progress in sport medicine and in training programs did not reduce the differences between genders in athletic results. Although it is difficult to compare male and female performances due to the participation in gender dedicated competitions (Thibault et al., 2010), it is possible that social beliefs affect the self-perceptions of competence and value attributed to sports, predicting in turn their sport participation (Guillet et al., 2006) and performance (Chalabaev et al. 2009a; Chalabaev et al. 2009b). However, these considerations are hard to apply to horse sport medicine.

Our results suggest that both the mean racing speed, best time, number of starts and placements, increased with age. It has been shown that younger animals have slower times at finish in German Trotters (Katona and Osterkorn, 1977). The evaluation of the career of a sample of NorthSwedish Trotters, aged between 3 and 12 years showed that younger horses also have poorer best times, . In addition, older animals (7 to 12 years old) have advantages over younger animals (3 to 6 years old) in percentages of races won (Rönningen, 1975). According to our results there are not significant differences in, number of starts, number of victories and placements, mean

racing speed, best time, mean and total earnings, which indicates that the chronic infection in clinically healthy subjects does not imply an alteration of the performances.

The presence of a correlation between atrophy score and stable only in Neg group horses probably imply a management effect on muscle development, that disappear in PCR positive horses. *Theileria equi* positive horses exhibit a correlation between atrophy and all the performances variables considered in our study. A moderate muscle atrophy led a decrease in performances if related to not atrophic horses. Has been demonstrated that the presence of an autoimmune inflammatory myopathy in horses with chronic EP, could be clinically expressed with different degrees of muscle atrophy (Pasolini et al., 2018). The examination of the muscle through a biopsy collection in the evaluation of positive horses could allow to demonstrate a correlation between myositis and reduced performance in PCR positive horses.

Myopathy clinical signs are inconstant and may include weakness and muscle pain, muscle atrophy and changes in haematological and serum biochemistry parameters. Only a moderate or a mild degree of muscle atrophy was found in the present sample population that consisted exclusively in well trained horses ready to compete. The absence of a higher activity of muscle markers such as CK, LDH and AST, can not be considered indicative of the absence of myositis, because the increase of these markers is considered a sign of myonecrosis and is inconstant during muscle inflammation (Valentine, 2010; Aleman, 2008). The hypothesis that myositis is the reason for poor performance is strengthened by the absence of significant correlations between performance and blood chemistry parameters in both negative and positive horses.

The haematology and serum biochemistry parameters, in fact, are significantly influenced only by signalment data, such as age, gender and weight. This results find partial agreement with the literature. However, the literature is based on studies about samples that are inhomogeneous in age, race and use, which makes difficult to compare our data and literature.

Haematology and serum biochemistry parameters in youngster and young adult horses are generally higher than in the older individuals (Robinson, 2003; Feldman et al., 2006; Reed et al., 2010; Saute et al., 2012).

In this study BUN, creatinine and globuline increases with increasing age of the horses; a trend was found also for total proteins and Hct values whereas ALB/GLOB ratio, ALKP, LDH and a trend for GGT values decreases in older horses. It was showed that the mean values of BUN and TP were

significantly higher in older horses (Gurgoze and Icen, 2010; Saute et al., 2009; Miknienė et al., 2014), whereas other authors did not find significant age-related variations in the serum creatinine and globulin levels (Ihedioha and Agina 2013). Furthermore, Total protein tended to increase with advancing age in donkeys and cats (Zinkl et al., 1990; Nakai et al., 1992). However, considering a wider age range, it was reported that TP are kept within the physiological range during most of the life of a healthy horse, up to senility, where a reduction of TP has been presented, mainly due to hypoalbuminemia, because of decreased food intake, reduced digestibility and less resistance to environmental factors, such as cold weather (Kaneko, 1997).

An ALPK concentration decrease when the age of the horse increases was also reported (Miknienė et al., 2014). In contrast with us, LDH serum concentrations did not differ significantly among the different age groups of not sport horses (Ihedioha and Agina 2013) while GGT concentrations increase when the age of the horses increases (Miknienė et al., 2014).

In our sample, males had significant higher TP and GLOB levels than females. Mares, on the other hand, had higher ALB/GLOB ratio, AST, LDH and WBCs values if compared to stallions group. Miknienė et al. (2014) reported lower AST concentration and WBCs number in mares than males. This statement is in contrast with our results. About WBCs some authors submit that a lower count in females may be due to androgen effect on erythropoiesis (Čebuli-Kaudune et al., 2002; Feldman et al., 2006; Altinsaat, 2008; Satue et al., 2009).

The body weight negatively affected ALKP concentration, PLTs and WBCs count; a trend was found for RBCs count and Hct percentage. The literature does not provide any correlation between body weight and haematobiochemical changes. It might be appropriate to check these results on a larger sample with a wider body weight range.

Furthermore, even if our measurements were made using the validated formula suggested by Carroll and Huntington (1988), a certain degree of inaccuracy can occur. Having the horse relaxed, standing squarely on a level surface with the head in the normal position and the presence of two people holding the tape for length measurement, are all tricks to consider for maximum accuracy in measuring (Hickman and Colles 1984).

4.5 Conclusions

The occurrence of PCR positivity to *T. equi* in IS sport horses is higher than 30%. Many managerial factors can influence the chance of sport horses to come in contact with the vector insect; the probability of the clinical manifestation of the pathology appear to be contained by a good management of athletic horses. The performances and haematological and serum biochemistry values of positive horses are not significantly different in positive PCR IS compared to negative ones. The amyotrophy highlighted in PCR positive horses, probably subsequent to an autoimmune myositis, may represent the earliest sign of losing the immune balance between host and parasite, which can be expressed with a reduction in performances. Without clinical and laboratory parameters indicative of infection, only specific diagnostic tests (IFAT and PCR) can allow early identification and therapy of positive horses. The use of muscle biopsies in the diagnostic *iter* in positive horses could allow an early identification of autoimmune myositis and indicate the possibility of pharmacological treatment for a parasitic sterilization.

- Aleman M. A review of equine muscle disorders. *Neuromuscul Disord.* 2008; 18(4):277–287.
- Altinsaat C. The Effects of Age and Gender on Blood Parameters in Arabian Horses. *Kafkas Universitesi veteriner fakultesi dergisie.* 2008. 14 (2).
- Alvarado, A., Marcoux, M. and Breton, L. (1989) The incidence of osteochondrosis in a Standardbred breeding farm in Quebec. *Proc. Am. Ass. equine Practns.* 35, 293-307.
- Bartolomé Del Pino LE, Nardini R, Veneziano V, et al. Babesia caballi and Theileria equi infections in horses in central-southern Italy: sero-molecular survey and associated risk factors. *Ticks Tick Borne Dis.* 2016;7(3):462–469.
- Beard, W.L., Bramlage, L.R., Schneider, R.K. and Embertson, R.M. (1994) Postoperative racing performance in Standardbreds and Thoroughbreds with osteochondrosis of the tarsocrural joint: 109 cases (1984-1990). *J. Am. vet. med. Am.* 204. 1655-1659.
- Brehm, W. and Staecker, W. (1999) Osteochondrosis in the tarsocrural Joint of Standardbred trotters: correlation between radiographic findings and racing performance. *Proc. Am. A s. equine Practns.* 45, 164-166.
- Carroll C. L. and Huntington P. J. (1988). Body condition scoring and weight estimation of horses. *Equine Veterinary Journal*, 20(1), 41–45.
- Casey R.A. (2007) Clinical Problems Associated with the Intensive Management of Performance Horses. In: Waran N. (eds) *The Welfare of Horses.* Animal Welfare, vol 1. Springer, Dordrecht
- Chalabaev, A., Sarrazin, P., & Fontayne, P. (2009a). Stereotype endorsement and perceived ability as mediators of the girls' gender orientationesoccer performance relationship. *Psychology of Sport & Exercise*, 10, 297e299.
- Chalabaev, A., Sarrazin, P., Trouilloud, D., & Jussim, L. (2009). Can sexundifferentiated teacher expectations mask an influence of sex stereotypes? *Alternative forms of sex bias in teacher expectations.* *Journal of Applied Social Psychology*, 39, 2469e2498.
- Čebuli-Kaudune N., Božic M., Kosec M. and Cestnik V. The influence of age and gender on haematological parameters in Lipizzan horses. *Journal of veterinary medicine.* 2002. V. 49. P. 217–221.
- Cohen J. (1988). *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences.* New York, NY: Routledge Academic
- de Waal DT. Equine piroplasmosis: A review. *Br Vet J* 1992;148:6–14.
- Couroucé-Malblanc, A., Leleu, C., Bouxhilloux, M. and Geffroy, O. (2006) Abnormal radiographic findings in 865 French Standardbred trotters and

- their relationship to racing performance. *Equine Vet. J.* 38, Suppl. 36, 417-422.
- Dabbene, I., Bullone, M., Pagliara, E., Gasparini, M., Riccio, B. and Bertuglia, A. (2018), Clinical findings and prognosis of interference injuries to the palmar aspect of the forelimbs in Standardbred racehorses: A study on 74 cases. *Equine Vet J*, 50: 759-765.
- de Waal DT. Equine piroplasmiasis: A review. *Br Vet J* 1992;148:6–14.
- Durward-Akhurst SA, Finno CJ, Barnes N, et al. Major histocompatibility complex I and II expression and lymphocytic subtypes in muscle of horses with immune-mediated myositis. *J Vet Intern Med.* 2016;30(4):1313–1321.
- Feldman F.B., Zinkl G.J., Jain N.C. *Schalm's veterinary hematology.* Blackwell publishing, Ltd. 2006. 5th ed. p. 1232
- Friedhoff KT, Soule C. An account on equine babesiosis. *Rev Sci Tech* 1996;15:1191–1201.
- Grandi G, Molinari G, Tittarelli M, et al. Prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infection in horses from northern Italy. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2011;11(7):955–956.
- Grondhal. A.M. and Engeland, A. (1995) Influence of radiographically detectable orthopedic changes on racing performance in Standardbred trotters. *J. Am. vet. med. Ass.* 206. 1013-1017.
- Grondhal, A.M., Gaustad. G. and Engeland, A. (1994) Progression and association with lameness and racing performance of radiographic changes in the proximal sesamoid bones of young Standardbred trotters. *Equine vet. J.* 26. 152-155.
- Guillet, E., Sarrazin, P., Fontayne, P., & Brustad, R. J. (2006). Understanding Female Sport Attrition in a Stereotypical Male Sport Within the Framework of Eccles's Expectancy-Value Model. *Psychology of Women Quarterly*, 30(4), 358–368.
- Gummow B, de Wet CS, and de Waal DT (1996) A sero-epidemiological survey of equine piroplasmiasis in the northern and eastern Cape Provinces of South Africa. *Journal Of The South African Veterinary Association*, 67, 204-208.
- Gurgoze S.Y., Icen H. (2010) The Influence of Age on Clinical Biochemical Parameters in Pure-bred Arabian Mares. *Jevs V.* 30, Issue 10, p. 569–574.
- Hailat NQ, Lafi SQ, al-Darraji AM, et al. Equine babesiosis associated with strenuous exercise: clinical and pathological studies in Jordan. *Vet Parasitol.* 1997;69(1–2):1–8.

- Hardy, I., Marcoux, M. and Breton, L. (1991) Clinical relevance of radiographic findings in proximal sesamoids boner of two-year-old Standardbreds in their first year of race training. *J. Am. med. vet. Ass.* 198, 2089-2094.
- Hickman J. and Colles C. (1984) Measurement of horses. *Vef. Rec.* 114,491-493.
- Hoppe, F. (1984) Radiological investigations of osteochondrosis dissecans in Standardbred trotters and Swedish Warmblood horses. *Equine vet. J.* 16,425-429.
- Ihedioha J. I. and Agina O. A. (2013) Serum biochemistry profile of nigerian horses (*equus caballus,linnaeus 1758*) *Animal Research International* (2013) 10(3): 1826 – 1833.
- Jacobson L. S. and Lobetti R. G. Rhabdomyolysis as a complication of canine babesiosis *Journal of Small Animal Practice* (1996) 37, 286-291.
- Jain N.C. (1993): *Comparative hematology of common domestic animals.* In: Jain N.C. (ed.): *Essentials of Veterinary Hematology.* 1st ed. Lea & Febiger, Philadelphia, PA. 19–53.
- Kaneko JJ (1997) Serum proteins and the dysproteinemias. In: Kaneko JJ (ed.): *Clinical Biochemistry of Domestic Animals.* 5th edn. Academic Press, London. 117–138.
- Katona, O. and K. Osterkorn. 1977. Genetic-statistical analysis of racing time in the German Trotter population. *Ziichtungskunde* 49:185.
- Kim, C.M., Blanco, L.B.C., Alhassan, A., Iseki, H., Yokoyama, N., Xuan, X., Igarashi, I., 2008. Diagnostic real-time PCR assay for the quantitative detection of *Theileria equi* from equine blood samples. *Vet. Parasitol.* 151, 158–163, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.10.023>.
- Koenen E.P.C., Aldridge L.I. (2002) Testing and genetic evaluation of sport horses in an international perspective. In: *Proc.7th World Congr. Genet. Appl. Livest. Prod., Montpellier, France*, p. 23.
- Langlois, B. 1975. Statistical and genetic analysis of earnings of 3-year-old Thoroughbreds in French flat races from 1971 to 1973. *Ann. Gkngt. Sgl. Anim* 7:387.
- Laus F, Veronesi F, Passamonti F, et al. Prevalence of tick borne pathogens in horses from Italy. *J Vet Med Sci.* 2013;75(6):715–720.
- Laws, E.G., Richardson, D.W., Ross, M.W. and Moyer, W. (1993) Racing performance of Standardbreds after conservative and surgical treatment for tarsocrural osteochondrosis. *Equine vet. J.* 25, 199-202.
- Lewis SS, Valberg SJ, Nielsen IL. Suspected immune-mediated myositis in horses. *Vet Intern Med.* 2007;21(3):495–503.

- Marasca, R., Maffei, R., Morselli, M., Zucchini, P., Castelli, I., Martinelli, S., Torelli, G., 2005. Immunoglobulin mutational status detected through single-round amplification of partial V(H) region represents a good prognostic marker for clinical outcome in chronic lymphocytic leukemia. *J. Mol. Diagn.* 7 (5), 566–574, [http://dx.doi.org/10.1016/S1525-1578\(10\)60589-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1525-1578(10)60589-2).
- McFarlane D., Sellon D.C., Gaffney D., Hedgpeth V., Papich M., Gibbs S. (1998): Hematologic and serum biochemical variables and plasma corticotropin concentration in healthy aged horses. *American Journal of Veterinary Research*, 59, 1247–1251.
- Miknienė Z, Maslauskas K, Kerzienė S, Kučinskienė J, Kučinskas A (2014) The effect of age and gender on blood haematological and serum biochemical parameters in žemaitukai horses. *Issn 1392-2130. Veterinarija ir zootechnika (Vet Med Zoot)*. T. 65 (87).
- Moretti A, Mangili V, Salvatori R, et al. Prevalence and diagnosis of Babesia and Theileria infections in horses in Italy: a preliminary study. *Vet J.* 2010;184(3):346–350.
- Nakai N, Nawa K, Maekawa M, Nagasawa H. Age-related changes in hematological and serum biochemical values in cats. *Jikken Dobutso* 1992;41:287–294.
- Pasolini, M.P., Pagano, T.B., Costagliola, A., Biase, D.D., Lamagna, B., Auletta, L., Fatone, G., Greco, M., Coluccia, P., Vincenzo, V., Pirozzi, C., Raso, G.M., Santoro, P., Manna, G., Papparella, S. and Paciello, O. (2018) Inflammatory Myopathy in Horses With Chronic Piroplasmiasis. *Vet. Pathol.* 55, 133–143.
- Plotka E.D., Eagle T.C., Gaulke S.J., Tester J.R., Siniff D.B. (1988): Hematologic and blood chemical characteristics of feral horses from three management areas. *Journal of Wildlife Disease*, 24, 231–239.
- Ralston S., Nockels C., Squires E. (1988): Differences in diagnostic test results and hematologic data between aged and young horses. *American Journal of Veterinary Research*, 49, 1387–1392.
- Reed S., Bayly W., Sellon D. *Equine internal medicine*. 2010. p. 2165.
- Robinson N. E., Sprayberry K. A., *Current therapy in equine medicine*, 5th ed. 2003, Elsevier Saunders. pp. 956-977.
- Rönningen, K. 1975. Genetics and environmental factors for traits in the Notth-Swedish trotter. *Z. Tierz. Zucht.* 92:164.
- Rovere, G., Ducro, B. J., van Arendonk, J. A. M., Norberg, E., & Madsen, P. (2016). Analysis of competition performance in dressage and show

- jumping of Dutch Warmblood horses. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 133(6), 503–512.
- Rüegg, S.R., Heinzmann, D., Barbour, A.D., Torgerson, P.R., 2008. Estimation of the transmission dynamics of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses. *Parasitology* 135(5), 555–565.
- Santos, T. M. dos, Roier, E. C. R., Santos, H. A., Pires, M. S., Vilela, J. A. R., Moraes, L. M. de B., ... Massard, C. L. (2011). Factors associated to *Theileria equi* in equids of two microregions from Rio de Janeiro, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 20(3), 235–241.
- Saute K., Blanco O., Munos A. Age-related differences in the hematological profile of Andalusian brood mares of Carthusian strain. *Veterinari Medicina*. 2009. 54. p. 175-182.
- Satue K., Hernandez A., Lorente, C. (2008): Erythrocyte parameters in Spanish horse: influence of age and gender. In: Proceedings of 10th Annual Congress of the European Society of Veterinary Clinical Pathology (ESVCP) and the 8th Biennial Congress of the International Society for Animal Clinical Pathology (ISACP), European Society of Veterinary Clinical Pathology, CAB Abstracts, Barcelona, Spain. 163–164.
- Saute K., Hernandez A. and Mugños A. Physiological factors in the interpretation of equine hematological profile. From: *Hematology – Science and Practice*, Dr. Charles Lawrie (Ed.). 2012. pp. 573-596.
- Sevinc, F., Maden, M., Kumas, C., Sevinc, M., Ekici, O.D., 2008. A comparative study on the prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in horse sub-populations in Turkey. *Vet. Parasitol.* 156, 173–177
- Steinman, A., Zimmerman, T., Klement, E., Lensky, I.M., Berlin, D., Gottlieb, Y., Baneth, G., 2012. Demographic and environmental risk factors for infection by *Theileria equi* in 590 horses in Israel. *Vet. Parasitol.* 187, 558–562.
- Storgaard Jorgensen, H., Proschowsky, H., Falk-Ronne, J., Willeberg. P. and Hesselholt, M. (1997) The significance of routine radiographic findings with respect to subsequent racing performance and longevity in standardbred trotters. *Equine Vet. J.*, 29, 55-59.
- Swash M., Schwartz M. S. Malaria myositis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1993 December; 56(12): 1328.
- Thibault, V. et al. Women and Men in Sport Performance: The Gender Gap has not Evolved since 1983. *J Sports Sci Med* 9, 214–223 (2010).

- Torre, F. (1999) Osteochondrosis and poor performance: current knowledge and perspectives In: Proceedings 46 th WEVA World Congress. pp 143-146.
- Valberg, S. J. (2018). Muscle Conditions Affecting Sport Horses. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 34(2), 253–276.
- Valentine, B.A., (2010) Serum CK and AST in Equine neuromuscular disease: searching for diagnostic approaches. *Equine Veterinary Education*, 15(5), 250-252.
- Vranova, M., Alloggio, I., Qablan, M., Vyskocil, M., Baumeisterova, A., Sloboda, M., Putnova, L., Vrtkova, I., Modry, D., Horin, P., 2011. Genetic diversity of the class II major histocompatibility DRA locus in European Asiatic and African domestic donkeys. *Infect. Genet. Evol.* 11, 1136–1141.
- Wise L.N., Kappmeyer L.S., Mealey R.H., Knowles D.P. Review of equine piroplasmiasis. *J Vet Intern Med.* 2013 Nov-Dec;27(6):1334-46.
- Zinkl JG, Mae D, Guzman MP, Farver TB, Humble JA. Reference ranges and the influence of age and sex on hematologic and serum biochemical values in donkeys (*Equus asinus*). *Am J Vet Res* 1990; 51:408–413.

