



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

**L' ATTIVITÀ DI RICERCA CORRENTE PRESSO L'IZS LAZIO E TOSCANA:
principali risultati e loro trasferibilità operativa
Roma, 30 maggio 2023**

**Controllo degli endoparassiti, stato
immunitario, infiammatorio e
microbiota intestinale negli equini**

(RC LT 08/20)



Dott.ssa Cristina Roncoroni

IZSLT Igiene delle Produzioni e Salute Animale

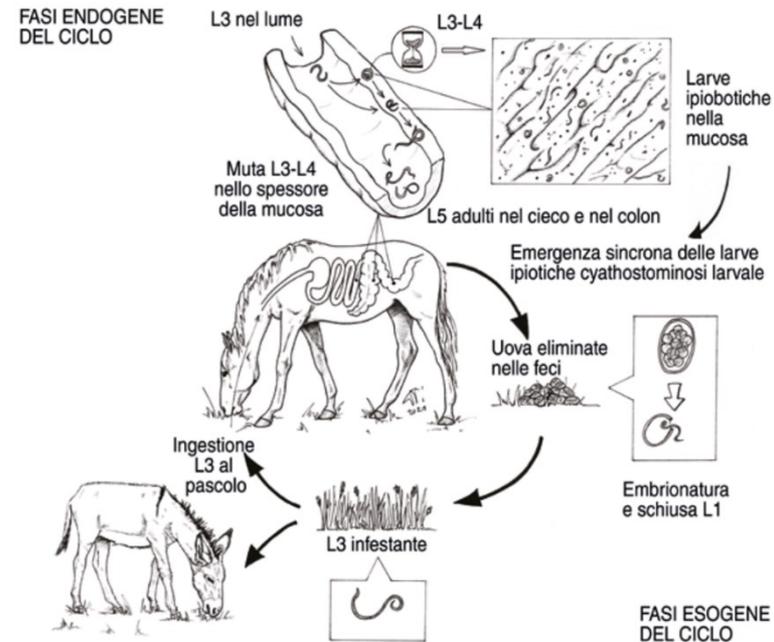


Introduzione



Strongili intestinali diffusi in asini e cavalli, i cyathostomi sono i più diffusi e potenzialmente patogeni.

Durante le migrazioni larvali nel grosso intestino, le larve possono incistarsi nella mucosa intestinale anche per anni, il massivo sviluppo delle larve incistate può determinare un imponente stato infiammatorio locale e sistemico, diarrea acquosa, iponatriemia, edemi e possibile esito letale.



Cyathostomiasi larvale





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri



Importanza dell'omeostasi intestinale, cui contribuiscono flora batterica e risposta immunitaria con l'influenza degli elminti. Il microbiota intestinale è fondamentale per salute e benessere, sue alterazioni possono determinare patologie cliniche. Fra le cause: fattori alimentari e sanitari, attività fisica, stress e terapie;

in molti casi si evidenzia un'associazione fra evento predisponente e squilibrio fra le popolazioni batteriche con una maggior probabilità di sviluppo di coliche del colon.





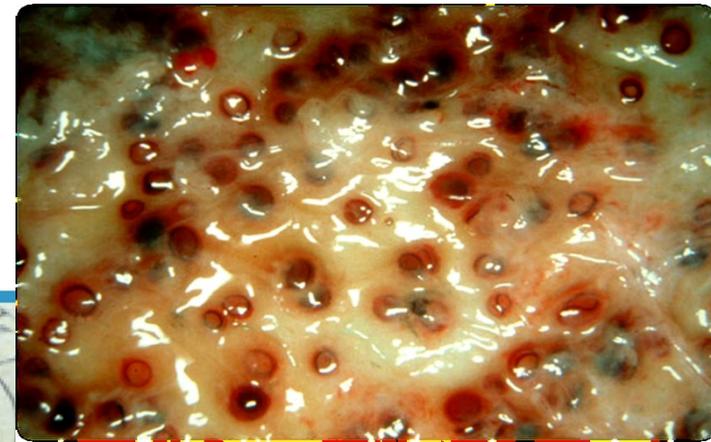
Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Obiettivi



Approfondire l'interazione tra elminti intestinali e flora batterica nel cavallo e nell'asino, soprattutto per quel che riguarda l'effetto dei trattamenti antielmintici sullo stato infiammatorio ed immunitario, in quanto rappresentano un ulteriore fattore di rischio per l'insorgenza di coliche, riconducibile, almeno in parte, all'alterazione del microbiota.

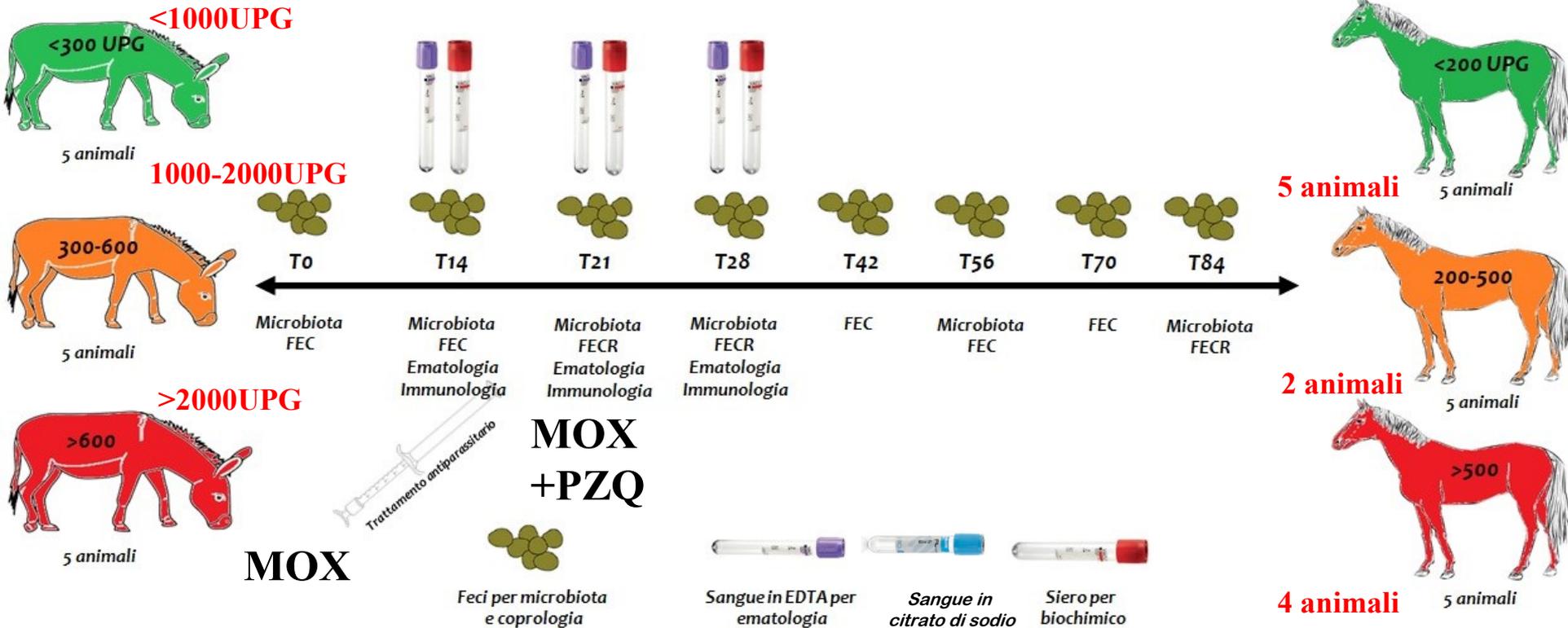
In effetti, l'interazione elmintoma-microbioma sembra avere un importante ruolo di modulazione della risposta immunitaria ed infiammatoria.



Materiali e metodi

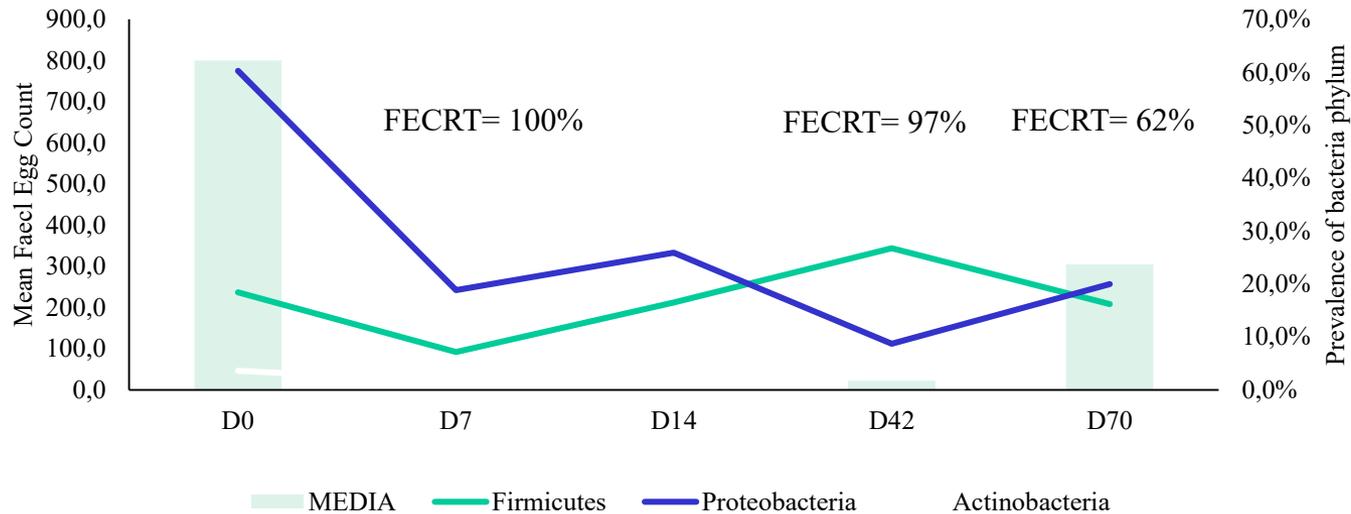
Toscana
Ottobre/dicembre

Lazio
Novembre/gennaio



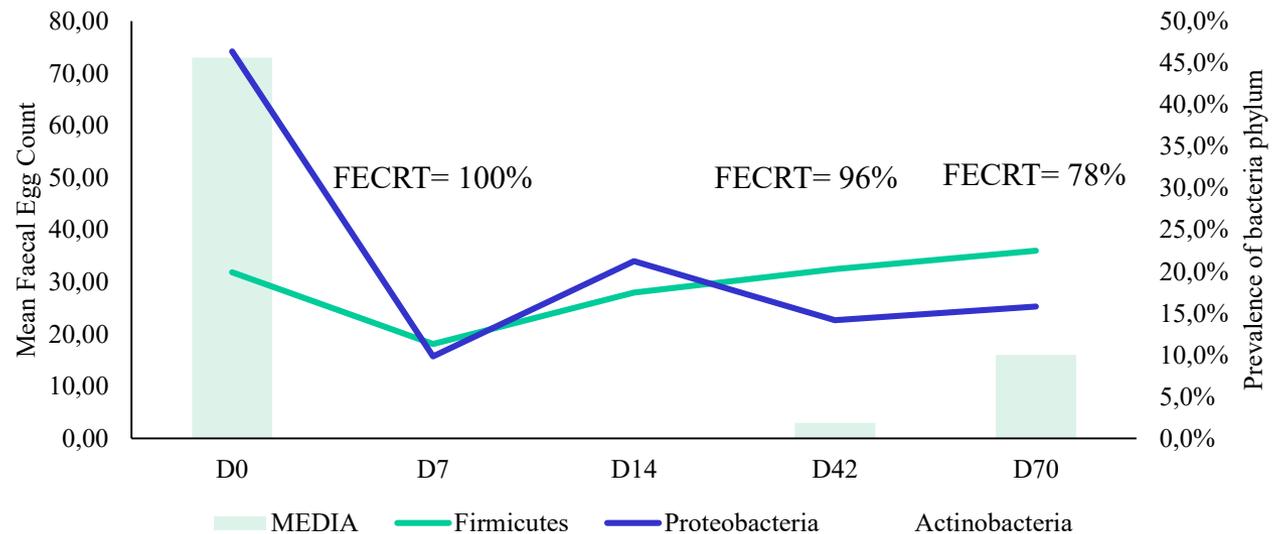
Risultati cavalli

Mean FEC and Phyla of High Contaminators



Alti

Mean FEC and Phyla of Low Contaminators



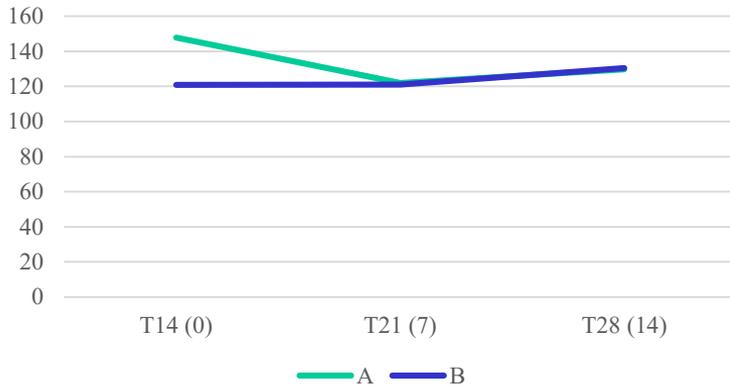
Bassi



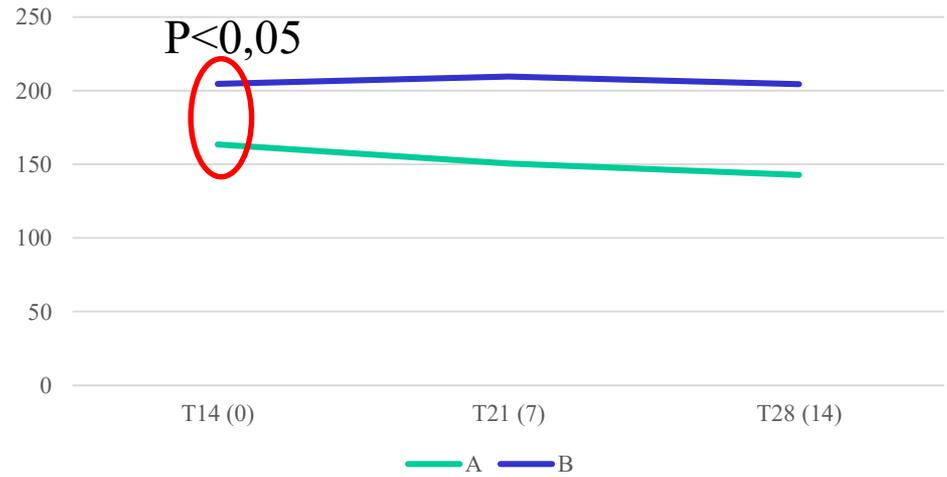
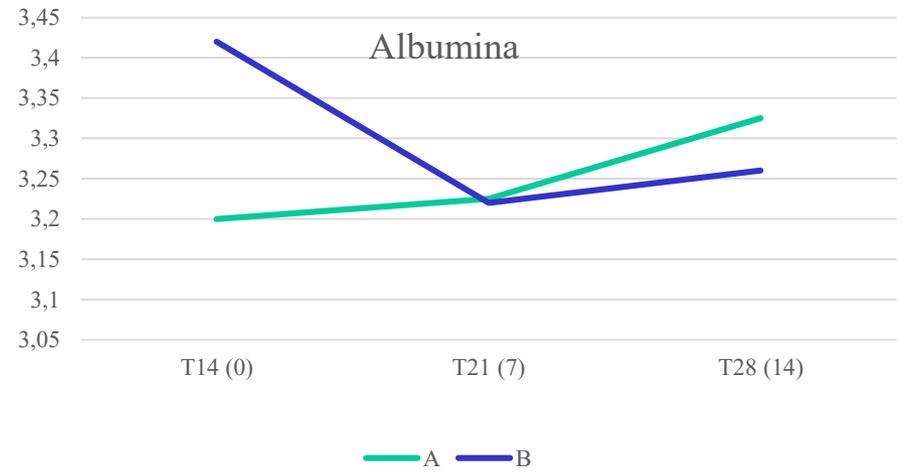
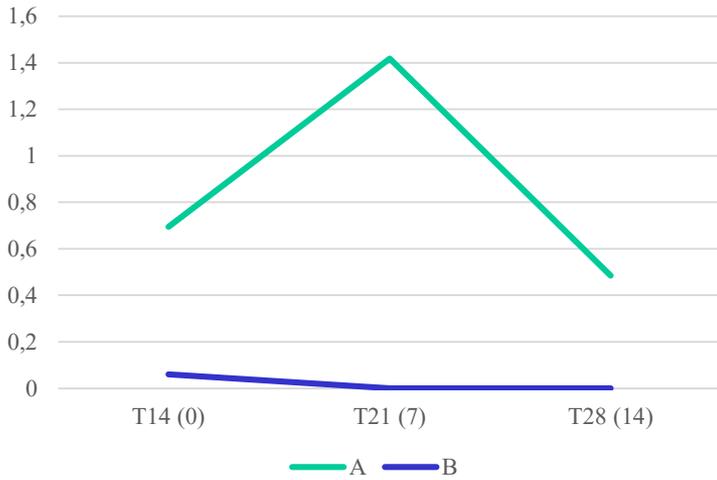


Risultati cavalli

Fibrinogeno

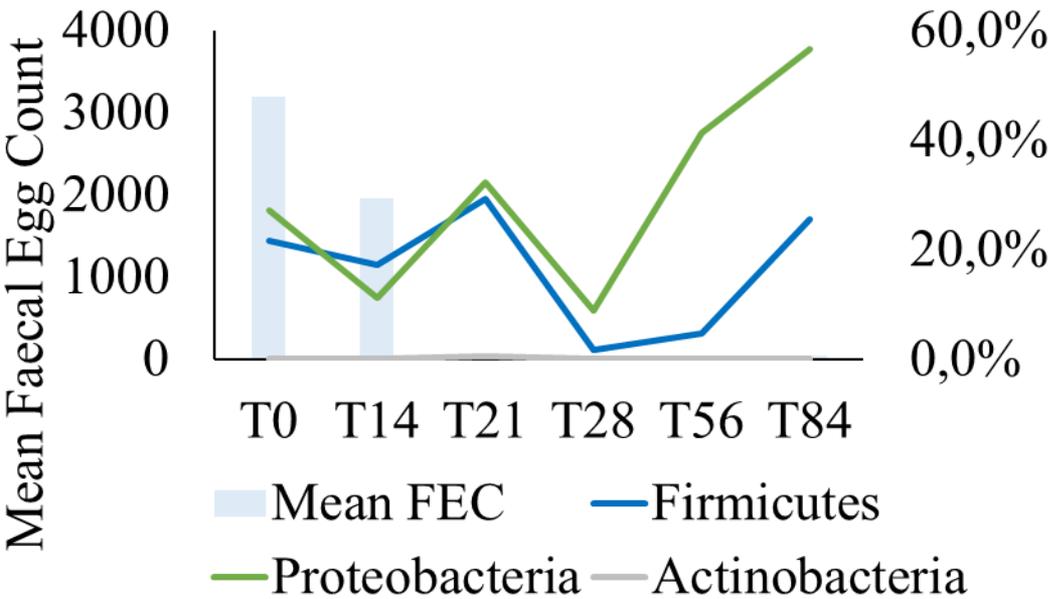


SAA



Alti

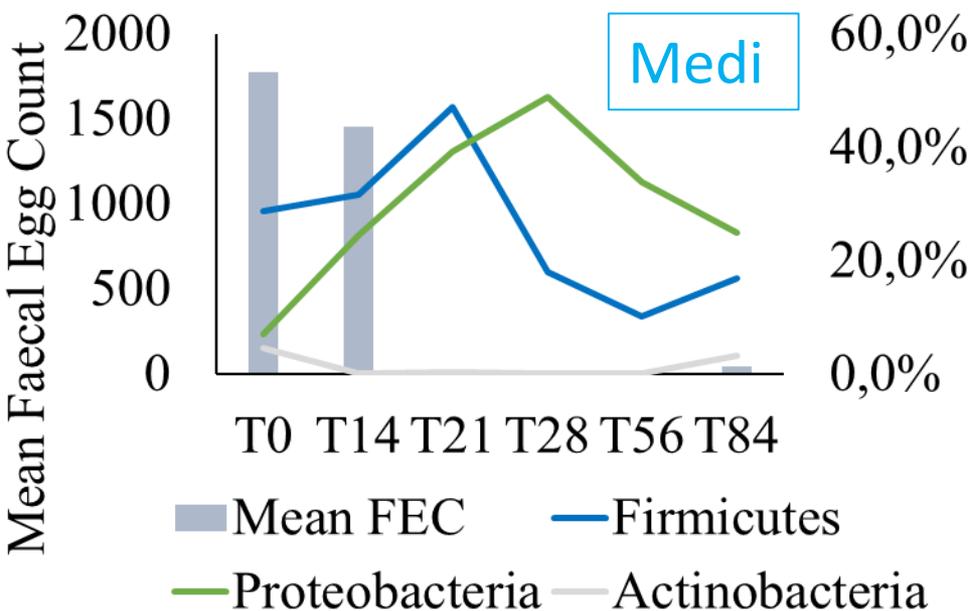
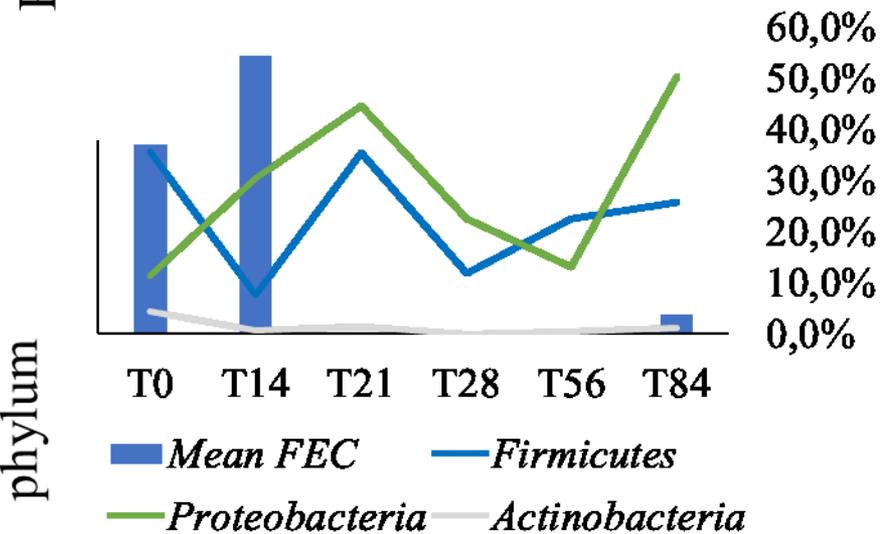
Mean FEC and Phyla



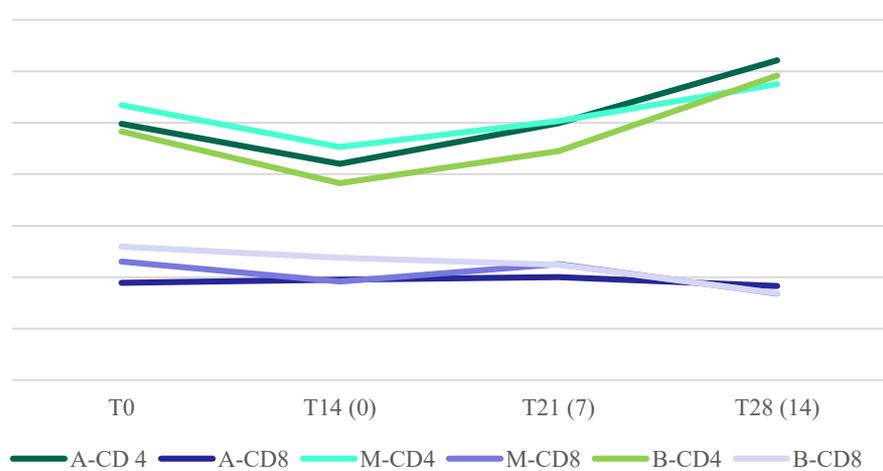
Risultati asini

Bassi

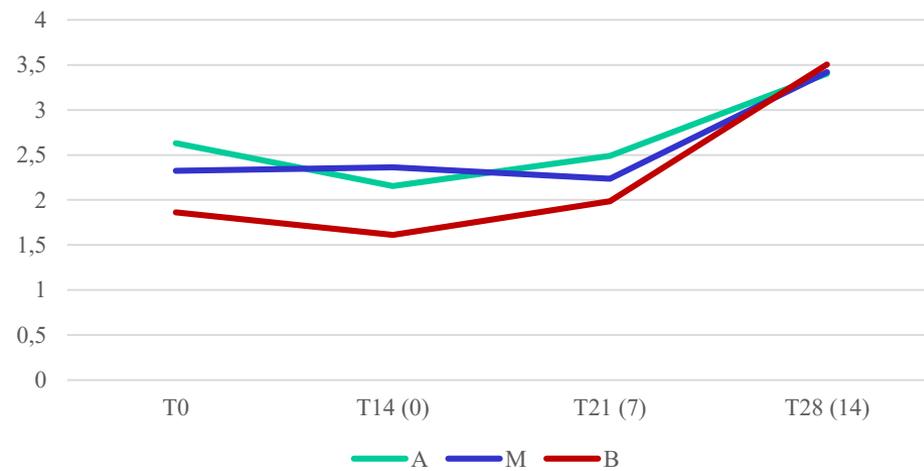
Mean FEC and Phyla



Sottopopolazioni linfocitarie



CD4/CD8





Impatto e trasferibilità operativa

Approfondire i meccanismi di interazione fra microbiota, parassiti e interventi antiparassitari potrebbe apportare modifiche alla gestione delle parassitosi, al momento unicamente basata sull'utilizzo di farmaci ad azione antielmintica.

Antielmintico resistenza evidenziata sia su cavalli che asini.

Servizio Napoli e IZSLT

In fase di stesura pubblicazione scientifica





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Conclusioni cavallo

Confermati i risultati di ricerche precedenti per il
comportamento del microbiota

Parametri infiammatori poco significativi per effetto
flogistico più locale che sistemico

Ruolo del ferro





Conclusioni asino

Comportamento del microbiota differisce
apparentemente da quello del cavallo

Parametri immunitari influenzati positivamente dal
trattamento.....

Considerare la differenza di grado di infestazione





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Ringraziamenti



Ministero della salute

Laboratori di parassitologia **Dott. De Liberato e Prof. Veneziano**

Laboratorio microbiologia **Prof.ssa Murru**

Università di Pisa **Prof.ssa Martini e Salari**

Laboratorio Salute e benessere animali da reddito **Dott.ssa Alfieri**

e tutti i colleghi che hanno aspettato l'arrivo dei campioni fino a tardi.....

**Francesco Buono, Antonio Rippa,
Francesco Mariottini, Cristina Groppi**

**Grazie per
l'attenzione**





$$FECR = \frac{UPG_{pre\ trattamento(T0)} - UPG_{post\ trattamento(T14)}}{UPG_{pre\ trattamento(T0)}}$$

Table 2: Suggested cutoff values (mean percent reduction in FEC) for interpreting results of strongyle FECRT

Anthelmintic	Expected efficacy if no resistance	Observed Results of the FECRT		
		Susceptible (no evidence of resistance)	Suspected resistant	Resistant
Fenbendazole/Oxibendazole	99%	>95%	90-95%	<90%
Pyrantel	94-99%	>90%	85-90%	<85%
Ivermectin/Moxidectin	99.9%	>98%	95-98%	<95%*





	ERP in corso di efficacia	ERP quando il farmaco è stato introdotto la prima volta	ERP in aziende con confermato antielmintico resistenza
Fenbendazolo	4-5 settimane	6 settimane	_*
Pyrantel	4-5 settimane	6 settimane	_*
Ivermectina	6-8 settimane	9-13 settimane	3-5 settimane
Moxidectina	10-12 settimane	16-22 settimane	4-6 settimane



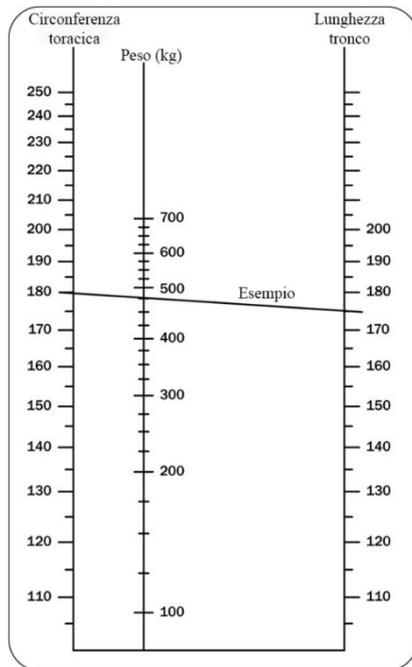
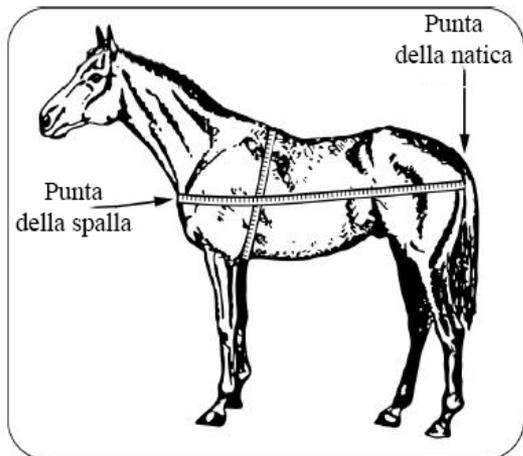


Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

The Donkey Sanctuary

Sidmouth, Devon, EX10 0NU.
Tel: 01395 578222 Fax: 01395 579266

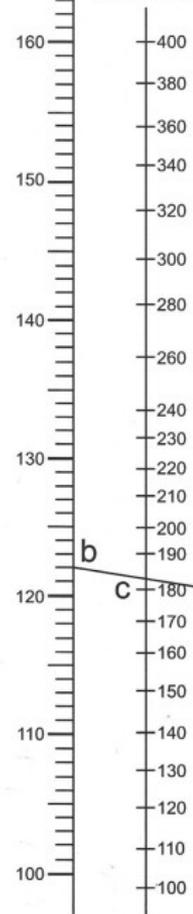
© The Donkey Sanctuary. All rights reserved, 2003.



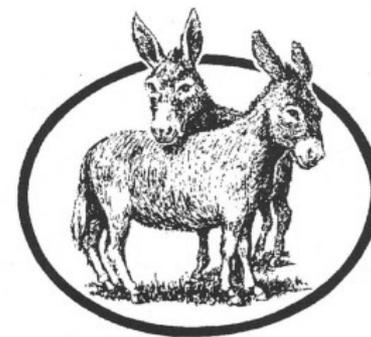
HEART GIRTH (cm)



WEIGHT (kg)



HEIGHT (cm)



b

c

a





Emocromo e formula leucocitaria (Cell-Dyn 3700 (ABBOTT));
Ferro, Zinco e Proteine totali (analizzatore automatico Olympus
AU 400);

Protidogramma con elettroforesi in gel di agar mediante
apparecchiatura Interlab G26;

Tipizzazione delle popolazioni leucocitarie (citofluorimetria
utilizzando FACSCalibur, Becton Dickinson);

Le proteine di fase acuta: albumina (Olympus AU 400),
Aptoglobina (APTOGLOBINA IMT, Futura system group),
Siero Amiloide A (Multispecies SAA ELISA kit, PHASE
RANGE, Tridelta Development Limited), Fibrinogeno
(Coatron, FIB TEClot, TECO).



Bacterial isolates obtained by seeding in plates serial dilutions obtained by dissolving 10 g of sample in 90 ml of diluent (Peptone Water).

The media used in this study were:

- Macconkay agar incubated for 48 hours at 37°C (Flora mesofila)
- MRS agar incubated for 48 hours at 37°C (Lattobacilli)
- Columbia agar supplemented with 5% sheep blood incubated at 37°C for 24 hours in aerophilia (Flora mesofila)
- Columbia agar supplemented with 5% sheep blood incubated anaerobically at 37°C for 48 hours (Flora anaerobia)

MALDI Biotyper® Sirius System, database Bruker MSP, software Bruker Compass (Bruker Daltonics).

strains were isolated and reseeded on Tryptone Soy Agar (TSA) and incubated at 37°C for 24h. Each colony was placed on the spectrophotometric reading plate and coated with 1 microliter of 70% formic acid and 1 microliter of α -cyano-4 hydroxycinnamic acid matrix solution (HCCA).



Basata sul desorbimento/ionizzazione laser assistito da matrice, comunemente indicato con l'acronimo MALDI, combinata con un analizzatore di ioni a tempo di volo (TOF). La tecnologia MALDI TOF, si è rivelata un approccio promettente per lo studio del microbiota in quanto consente di misurare in tempi rapidi il peso molecolare di macromolecole e di determinare la loro identità in base al rapporto massa/carica (m/z).



Materiali e metodi: ANALISI MICROBIOLOGICA

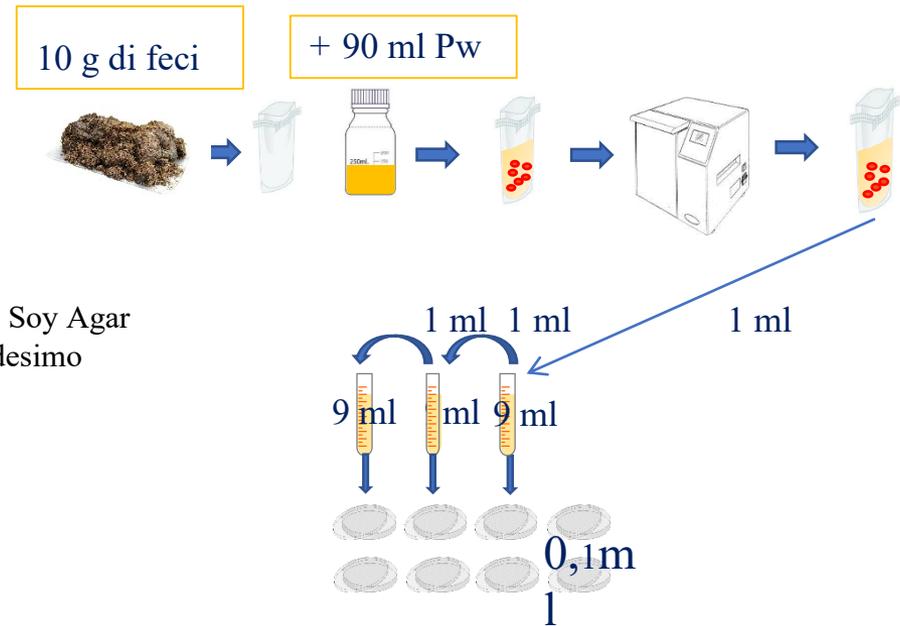
Isolamento batterico

Ricerca di:

- flora mesofila totale su Columbia Agar Sheep Blood 5%
- flora anaerobia totale su Columbia Agar Sheep Blood 5%
- flora mesofila totale Gram- su Macconkay Agar
- lattobacilli su de Man-Rogosa-Sharpe agar (MRS)

Tutte le colonie una volta contate, prelevate e trasferite su Tryptone Soy Agar (TSA) eccetto quelle contate su MRS, per essere riseminate sul medesimo terreno dopo la conta;

Incubazione a 37°C: per 24/48h.



Materiali e metodi: ANALISI

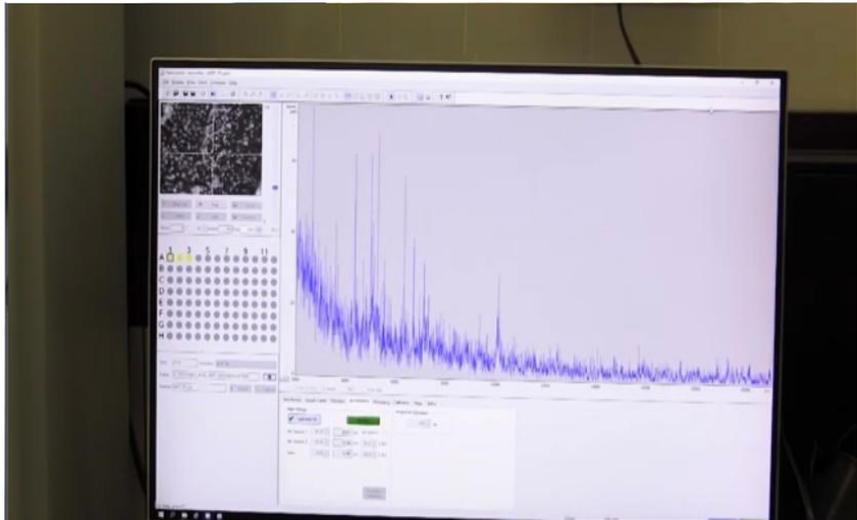
MICROBIOLOGICA

Identificazione tramite spettrofotometria di massa MALDI-

TOF

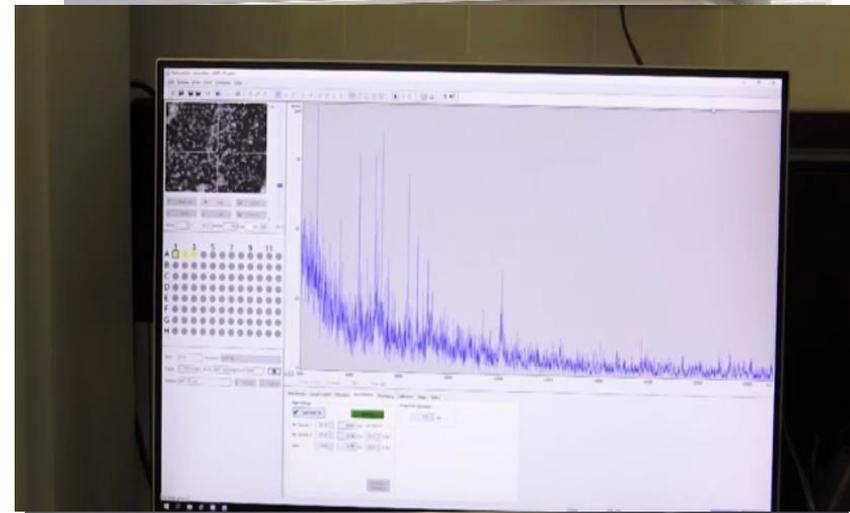
Metodo diretto

Ciascuna colonia isolata su TSA o MRS è stata seminata singolarmente e direttamente in uno specifico spot sulla piastra Maldi-Tof.



Metodo di estrazione proteica

- 1) Ciascuna colonia isolata su TSA o MRS, trasferita in una Eppendorf contenente 1 ml di TSB o MRS e lasciata ad incubare a 30°C per una notte;
- 2) Estrazione proteica (centrifugazioni, utilizzo di vortex e aggiunta dei solventi HCOOH e CH3CN);
- 3) Trasferimento del contenuto di ciascuna Eppendorf su specifici spot sulla piastra Maldi-Tof.



Risultati: ANALISI MICROBIOLOGICA

generi batterici (numero e %) rinvenuti nei diversi time point

PHYLUM	FAMIGLIA	GENERE	T ₀	T ₇	T ₁₄	T ₄₂	T ₇₀
FIRMICUTES	Bacillaceae	<i>Bacillus</i> spp.	12/228 (5,26%)	1/92 (1,09%)	3/164 (1,83%)	3/95 (3,16%)	4/91 (4,40%)
		<i>Fictibacillus</i> spp.				1/95 (1,05%)	
	Enterococcaceae	<i>Enterococcus</i> spp.	2/228 (0,88%)	1/92 (1,09%)	18/164 (10,98%)	2/95 (2,11%)	3/91 (3,30%)
	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i> spp.				1/95 (1,05%)	
		<i>Lactococcus</i> spp.			1/164 (0,61%)		
		<i>Ligilactobacillus</i> spp.			4/92 (4,35%)		
		<i>Weissella</i> spp.	29/228 (12,72%)	13/92 (14,13%)	28/164 (17,07%)	62/95 (65,26%)	31/91 (34,07%)
	Paenibacillaceae	<i>Paenibacillus</i> spp.	2/228 (0,88%)		1/164 (0,61%)	1/95 (1,05%)	
	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i> spp.		2/92 (2,17%)			
	Streptococcaceae	<i>Streptococcus</i> spp.	6/228 (2,63%)	3/92 (3,26%)	12/164 (7,32%)	2/95 (2,11%)	6/91 (6,59%)
PROTEOBACTERIA	Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i> spp.	2/228 (0,88%)			1/95 (1,05%)	
	Enterobacteriaceae	<i>Citrobacter</i> spp.	1/228 (0,44%)				
		<i>Cronobacter</i> spp.	1/228 (0,44%)				
		<i>Enterobacter</i> spp.	14/228 (6,14%)	4/228 (4,35%)	1/164 (0,61%)	1/95 (1,05%)	4/91 (4,40%)
		<i>Escherichia</i> spp.	139/228 (60,96%)	59/92 (64,13%)	98/164 (59,76%)	20/95 (21,05%)	43/91 (47,25%)
		<i>Kosakonia</i> spp.	2/228 (0,88%)				
		<i>Lelliottia</i> spp.	7/228 (3,07%)				
	<i>Siccibacter</i> spp.	1/228 (0,44%)					
ACTINOBACTERIA	Micrococcaceae	<i>Arthobacter</i> spp.	7/228 (3,07%)		2/164 (1,22%)		
	Promicromonosporaceae	<i>Cellulosimicrobium</i> spp.	1/228 (0,44%)	3/92 (3,26%)			
	Microbacteriaceae	<i>Microbacterium</i> spp.	2/228 (0,88%)	1/92 (1,09%)			
	Nocardiaceae	<i>Rhodococcus</i> spp.		1/92 (1,09%)			





Esame copromicroscopico quali-quantitativo per flottazione per la ricerca di uova di nematodi, tramite la combinazione delle metodiche Fill-Flotac/Mini-Flotac (Cringoli et al., 2017), con sensibilità analitica pari a 5 uova per grammo di feci (UPG). Nello specifico, sono stati utilizzati 5 g di feci diluiti in 45 ml di soluzione flottante a base di saccarosio (Sheather's saturated sugar solution) (peso specifico 1.250) (Lester e Matthews, 2014).

