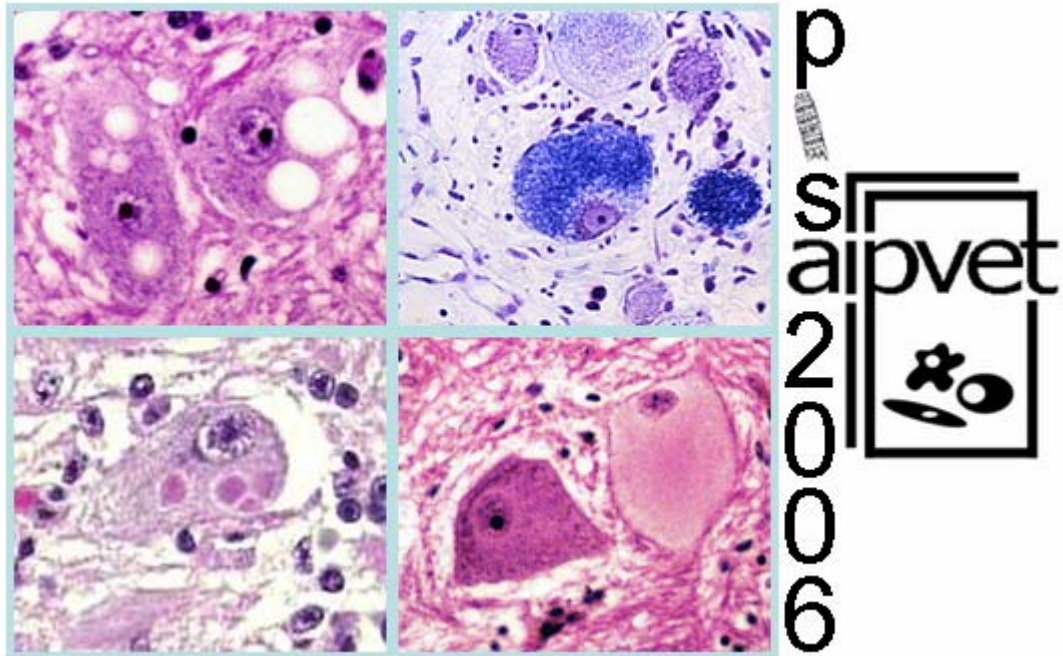


AIPVet

Associazione Italiana di Patologia Veterinaria

ATTI III Congresso Nazionale

ISSN 1825-2265



con la partecipazione

della Società Italiana di Patologia Tossicologica e Sperimentale

del Gruppo di Patologia Clinica Veterinaria

Pisa, 11-13 Maggio 2006

SPONSOR



Premio Ennio Sanna 2006

ANALISI CITOFUORIMETRICA DEL PATTERN ANTIGENICO SU ASPIRATI LINFONODALI IN CORSO DI LINFOMA CANINO
Maria Elena Gelain, Maria Mazzilli, Stefano Comazzi

Premio Rosario Preziosi 2006

MENINGOENCEFALITE GRANULOMATOSA DA PROTOHECA IN UN CANE. *Salvadori Claudia, Mandrioli Luciana, Giuliano Bettini, Arispici Mario, Cantile Carlo*

La successione delle presentazioni in questo volume degli Atti riflette, sia per le comunicazioni orali che per i poster, l'ordine di elencazione nel programma definitivo.

Breve ricordo di Rosario Preziosi

Relazioni ad invito

EVOLUZIONE RECETTORIALE, PATOGESESI E TROPISMO NELL'INFLUENZA AVIARE
Delogu Mauro

CYTOTOXIC DRUGS AND CARDIOTOXICITY
Giusti Anna Maria

ASPETTI DERMATOPATOLOGICI ED IMMUNOPATOGENETICI DELL'INFEZIONE DA LEISHMANIA
Brachelente Chiara

Comunicazioni

LESIONI EPATICHE INDOTTE DA UN INIBITORE DELLA TIROSINA-FOSFATASI NEL CANE
Cristiano Marozin, Michele Ardizzone, Michela Carbonatto, Sergio Peano

SVILUPPO TOSSICOLOGICO DI PRODOTTI DA UTILIZZARE NELLA DIETA PER IL CONTROLLO DELL'APPETITO
Alberta Argentino Storino, Isabella Andreini, Eleonora Mattei

LA VALUTAZIONE ISTOPATOLOGICA DEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE NEGLI STUDI DI TOSSICOLOGIA GENERALE SU COMPOSTI POTENZIALMENTE NEUROTOSSICI: LIMITI DELLE PROCEDURE ATTUALI E NUOVE PROPOSTE METODOLOGICHE
Anna Lanzoni, Patrizia Cristofori

LA VALUTAZIONE DELL'APPARATO RIPRODUTTORE MASCHILE NEL CANE BEAGLE NEGLI STUDI DI TOSSICOLOGIA GENERALE: USO E UTILITA' DI INDAGINI COLLATERALI IN VIVO
Luca Cavaliere, Anna Lanzoni, Patrizia Cristofori

STUDIO DELLE GIUNZIONI NEUROMUSCOLARI IN UN MODELLO MURINO DI SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA E VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DI UN TRATTAMENTO CRONICO CON ACETIL-L-CARNITINA
Pesce Daniela, Alfano Anna Maria, Agostini Patrizia Onali Assunta, Perna Elisa, De Angelis Clara, Lucreziotti Maria Rita, Carminati Paolo, Bendotti Caterina

L' α_1 -GLICOPROTEINA ACIDA (AGP) MODULA L'APOPTOSI SPONTANEA E INDOTTA DA STAUROSPORINA IN MONOCITI E NEUTROFILI BOVINI MEDIANTE I RESIDUI DI ACIDO SIALICO
Pocacqua Vanessa, Bronzo Valerio, Miranda-Ribera Alba, Lecchi Cristina, Sartorelli Paola, Scaccabarozzi Licia, Lodde Valentina.

ESPRESSIONE DI HEAT SHOCK PROTEINS (HSPs) IN CORSO DI PATOLOGIE VIRALI DEL SUINO
Marco Rondena, Daniela Gelmetti, Pietro Riccaboni, Chiara Giudice, Mario Finazzi

INDAGINI PATOGENETICHE SUI PLESSI DEL SISTEMA NERVOSO ENTERICO DI OVINI DI RAZZA SARDA INFETTATI PER OS CON L'AGENTE DELLA SCRAPIE CON DIVERSA SUSCETTIBILITÀ GENETICA NEI CONFRONTI DELLA MALATTIA
Giuseppe Marruchella, Daniela Malatesta, Luigi Petrucci, Giovanna Lalatta Costerbosa, Paolo Clavenzani, Roberto Chiocchetti, Maurizio Mazzoni, Valeria Albanese, Umberto Agrimi, Claudia D'Agostino, Gabriele Vaccari, Romolo Nonno, Luigi De Grossi, Francesca Rosone, Francesco Giordani, Ciriaco Ligios, Giuseppe Sarli, Giovanni Di Guardo

ACCUMULO DI PRP^{Sc} NELLA GHIANDOLA MAMMARIA DI PECORE COINFETTATE SPERIMENTALMENTE CON SCRAPIE E VIRUS MAEDI-VISNA

Cancedda Maria Giovanna, Sigurdson J.Christina, Saba Mariangela, Carcassola Gabriella, Demontis Franca, Patrizia Uras, Rosalba Zucca, Santucci Cinzia, Demurtas Giulia, Maestrone Caterina, Madau Laura, Ligios Ciriaco, Aguzzi Adriano

STUDIO DI UN MODELLO ANIMALE PER LA SINDROME MEN I UMANA

Rossi Giacomo, Mari Subeide, Pietro Guli, Renzoni Giacomo, Magi Gian Enrico

ANALISI DELL'ESPRESSIONE DEL RECETTORE PER GLI ESTROGENI A E B, DEL RECETTORE PER IL PROGESTERONE E DI ERB-B2/NEU IN CARCINOMI MAMMARI FELINI E CONTROLLI APPAIATI MEDIANTE RT-PCR REAL-TIME

Luca Bargelloni, Barbara Cardazzo, Jenny Antonello, Valentina Zappulli, Massimo Castagnaro

ANGIOMATOSI CUTANEA NELLA SPECIE CANINA: DATI CLINICI E CARATTERIZZAZIONE ISTOPATOLOGICA

Avallone Giancarlo, Crippa Luca, Iussich Selina, Roccabianca Paola

SCREENING PRE-DIAGNOSTICO DI CAMPIONI CITOLOGICI NON COLORATI COME METODO DI MIGLIORAMENTO DELL'ADEGUATEZZA DELL'ALLESTIMENTO

Carlo Masserdotti

FENOTIPIZZAZIONE ISTOPATOLOGICA E DETERMINAZIONE DELLA CAUSA DI MORTE PREMATURA IN TOPI TRANSGENICI CON OVERESPRESSIONE UBIQUITARIA DI FRG1

Luca Crippa, Maurizio Moggio, Chiara Zecca, Rossella Tupler

EFFETTI MEDIATI DALLA PROLATTINA NEGLI STUDI DI TOSSICOLOGIA GENERALE NEL RATTO: INTERPRETAZIONE ED ESTRAPOLAZIONE ALLA CLINICA.

Rossella Defazio, Anna Lanzoni, Patrizia Cristofori, Elena Giannotti

ESEMPIO DI UTILIZZO DELLA MICROSCOPIA ELETTRONICA A SCANSIONE AMBIENTALE (ESEM) ASSOCIATA A MICROANALISI A RAGGI X IN UNO STUDIO DI TOSSICOLOGIA.

Ivo Faustinelli, Marco Rossetti, Patrizia Cristofori, Anna Lanzoni

PATOLOGIA RESPIRATORIA DA MYCOPLASMA BOVIS IN VITELLI E BOVINI ADULTI DA MACELLO DEL NORD ITALIA

Radaelli Enrico, Burigana Nicoletta, Ripamonti Giuseppe, Loria Guido Ruggero, Luini Mario, Nicholas Robin A. J., Scanziani Eugenio

ESPRESSIONE GENICA INDOTTA DAL 17 BETA ESTRADIOLIO IN CELLULE STROMALI DI PROSTATA BOVINA: SVILUPPO DI MARCATORI GENICI COINVOLTI NELL'USO ILLEGALE DI PROMOTORI DI CRESCITA

Raffaella De Maria, Sara Divari, Mariella Gorla, Chiara Mulasso, Francesca Spada, Gabriele Zancanaro Selina Iussich, Bartolomeo Biolatti

ALTERAZIONI MACROSCOPICHE E ISTOLOGICHE NEL RENE DI BOVINO AL MACELLO

Aresu Luca, Pregel Paola, Bollo Enrico, Valenza Federico, Bono Michela, Sereno Alessandra, Biolatti Bartolomeo

INFEZIONE SISTEMICA LETALE DA CORONAVIRUS IN UN CANE: LESIONI PATOLOGICHE E IMMUNOISTOCHEMICA

Zappulli Valentina, Caliaro Diego, Cavicchioli Laura, Tinelli Antonella, Castagnaro Massimo

NEFROPATIE DEI CARNIVORI DOMESTICI: CONFRONTO TRA LE METODICHE ISTOLOGICHE E L'ESAME ULTRASTRUTTURALE

Scaglione Frine Eleonora, Catalano Deborah, Cornaglia Enzo, D'Angelo Antonio, Brovida Claudio, Zanatta Renato, Capucchio MariaTeresa

L'OSSIFICAZIONE DURALE DEL CANE: RILIEVI MACROSCOPICI ED ISTOLOGICI

Capucchio Maria Teresa, Zagarella Paolo Giovanni, Catalano Deborah, Amedeo Stefano, Sammartano Federica, Scaglione Frine Eleonora, Valenza Federico, Valazza Alberto

IDROCEFALO INTERNO ASSOCIATO AD ENCEFALITE PERIVENTRICOLARE IN UNA GIOVANE VOLPE

Pavone Silvia, Vitellozzi Giovanni, Mandara Maria Teresa

DUE CASI DI MALFORMAZIONE SCHELETRICA IN PULEDRI: PATOLOGIA ED IPOTESI EZIOLOGICHE

Riccaboni Pietro, Rondena Marco, Zani Davide, Turci Tania, Zavaglia Giovanni, di Giancamillo Mauro, Finazzi Mario

RABDOMIOSARCOMA EMBRIONALE CON INVASIONE DEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE E METASTASI LINFONODALI IN UN CANE

Rossetti Enrica, Pintore Laura, Bernardini Marco, Castagnaro Massimo

STUDIO FENOTIPICO E MOLECOLARE DEL TUMORE A CELLULE GIGANTI DELL'OSSO (TCG₀) DEL CANE E DEL GATTO. RISULTATI PRELIMINARI

Leonardi Leonardo, Mechelli Luca, Benassi Maria Serena, Ciorba Alessandro, Brown C. Corrie, Uhl Elizabeth

ANALISI CITOFLUORIMETRICA DEL PATTERN ANTIGENICO SU ASPIRATI LINFONODALI IN CORSO DI LINFOMA CANINO

Maria Elena Gelain, Maria Mazzilli, Stefano Comazzi

VARIABILITÀ DEGLI INTERVALLI DI RIFERIMENTO DI PARAMETRI ELETTROFORETICI NEL CAVALLO NEONATO IN FUNZIONE DEL TIPO DI PARTO (INDOTTO O SPONTANEO) E DELLA DISTANZA PARTO/PRELIEVO

Giordano Alessia, Manfrin Margherita, Massimiliano Battocchio, Sara Panzani, Paltrinieri Saverio

CORONAVIROSI E RISPOSTA IMMUNITARIA: RISULTATI PRELIMINARI SULLA CONCENTRAZIONE SIERICA DI INTERFERONE- γ IN GATTI SINTOMATICI E NON

Giordano Alessia, Gelain Maria Elena, Tagliabue Serena, Paltrinieri Saverio

LE NEOPLASIE CUTANEE DI ORIGINE EPITELIALE NEL CANE E NEL GATTO: CORRELAZIONE TRA DIAGNOSI CITOLOGICA ED ISTOLOGICA

Morini Maria, Papini Marco, Bettini Giuliano

ESPRESSIONE DELLA FOSFATASI ALCALINA PLACENTARE NEI SEMINOMI DEL CANE

Grieco Valeria, Riccardi Elena, Rondena Marco, Ciampi Valentina, Finazzi Mario

APPROCCIO IMMUNOISTOCHEMICO NELLA DIAGNOSI DEI TUMORI DELLE CELLULE DELLA GRANULOSA DEL CANE

Riccardi Elena, Grieco Valeria, Verganti Sara, Finazzi Mario

EMANGIOSARCOMA DELLA III PALPEBRA IN UN CAVALLO

Ricci Giovanni, Lepri Elvio, Sforza Monica, Gialletti Rodolfo, Mechelli Luca

CISTI BILIARI MULTIPLE IN UN FEGATO DI LEONE (*PANTHERA LEO*)

Bettini Giuliano, Pascotto Ernesto, Guadagini Davide

PRINCIPALI REPERTI POST-MORTEM NEI CETACEI APIAGGIATI LUNGO LE COSTE ITALIANE DAL 2000 ALL'INIZIO DEL 2006

Sandro Mazzariol, Giovanni Di Guardo, Giuseppe Marruchella, Camilla Butti, Bruno Cozzi, Seamus Kennedy, Cinzia Benazzi, Lara Fichtel, Stefano Furlati, Paolo Zucca, Raffaella Iorio and Massimo Castagnaro

STUDIO PATOGENETICO DELL'INFEZIONE SPERIMENTALE CON VIRUS INFLUENZALE AD ALTA PATOGENICITÀ H5N1 IN ANATRE DI PECHINO

Vascellari Marta, Granato Anna, Basilicata Lara, Trevisan Laura, Mutinelli Franco

STATO SANITARIO E PATOLOGIA DELLA NUTRIA (*MYOCASTOR COYPUS*)

Bollo Enrico, Pregel Paola, Gennero Silvia, Rosati Sergio, Nebbia Patrizia, Ferroglio Ezio, Biolatti Pier Giuseppe

Poster

CITOLOGIA ASPIRATIVA CON AGO SOTTILE IN 20 CASI DI PATOLOGIA RENALE DEL CANE. *Militerno Gianfranco, Franconeri Lorena, Vezzali Enrico*

VALUTAZIONE DELLA FRAZIONE APOPTOTICA CONDROCITARIA IN FRAMMENTI OSTEOCONDROTICI DI CAVALLO. *Bongiovanni Laura, Grasselli Aldo, Grigolo Brunella, Muttini Aurelio, Della Salda Leonardo*

PARAMETRI EMATICI, SALIVARI E RILIEVI ISTOLOGICI QUALI INDICI DI TRATTAMENTO INDOTTO CON DESAMETASONE NEL VITELLO DA CARNE. *Enrico Cabassi, Francesca Miduri, Anna Marin, Anna Maria Cantoni, Rosanna Di Lecce, Attilio Corradi*

ENCEFALITOOZONOSI (ENCEPHALITOOZON CUNICULI) IN CONIGLI MACELLATI DELLA ROMAGNA E DEL VENETO: QUADRI ANATOMOISTOPATOLOGICI ED ULTRASTRUTTURALI. *Militerno Gianfranco, Morandi Federico, Taffetani Luca, Trevisani Marcello, Marcato Paolo Stefano*

INDAGINI CITOFLUORIMETRICHE, SIEROLOGICHE E DETERMINAZIONE DI CITOCHINE IN SUINI VACCINATI CONTRO LA MALATTIA DI AUJESZKY. *Ferrari Luca, De Angelis Elena, Corradi Attilio, Saleri Roberta, Cavalli Valeria, Smeets Jos, Blanchaert Andrè, Gozio Stefano, Martelli Paolo, Borghetti Paolo*

FIBRODISPLASIA OSSIFICANTE PROGRESSIVA (FOP) IN UN GATTO. *Sforna Monica, Capuccini Silvia, Gallorini Francesco, Brachelente Chiara, Lepri Elvio*

ESPRESSIONE NELLA GHIANDOLA MAMMARIA BOVINA E NEL LATTE DI UNA ISOFORMA DELLA α 1-GLICOPROTEINA ACIDA (AGP). *Miranda Ribera Alba, Pocacqua Vanessa, Avallone Giancarlo, Sartorelli Paola, Fortin Riccardo, Lecchi Cristina, Rebucci Raffaella, Scaccabarozzi Licia, Ceciliani Fabrizio*

VALORE DIAGNOSTICO DELLA β -CATENINA NEI TUMORI DELLE GHIANDOLE EPATOIDI DEL CANE. *Mazzullo Giuseppe, Alessandra Sfacteria, Marielda Cataldi, Gionata De Vico*

LEIOMIOSARCOMA INTRA-ADDOMINALE IN UN FURETTO (*MUSTELA PUTORIUS FURO*): CARATTERIZZAZIONE ISTOPATOLOGICA ED IMMUNOISTOCHEMICA. *Pezzolato Marzia, Varello Katia, Mascarino Daniela, Vascellari Marta, Bozzetta Elena*

MELANOSI NEL SUINO NERO SICILIANO. CONTRIBUTO ALLA CONOSCENZA ED IPOTESI EZIO-PATOGENETICHE. *Lanteri Giovanni, Liotta Luigi, Marino Fabio, Chiofalo Vincenzo, Macrì Battesimo*

VASCULOPATIA RETINICA IN GATTI CON INSUFFICIENZA RENALE CRONICA: DATI PRELIMINARI. *Giudice Chiara, Muscolo Cristina, Rondena Marco, Grieco Valeria*

RILIEVI ISTOPATOLOGICI ED IMMUNOISTOCHEMICI IN PLACENTE IN CORSO DI ABORTO BOVINO: STUDIO DI CAMPO. *Pittioni Eugenio, Pascotto Ernesto, Galeotti Marco*

ESPRESSIONE DELLA TIMIDINA FOSFORILASI NEI TUMORI MAMMARI DEL CANE. *Zizzo Nicola, Tinelli Antonella, Lionetti Antonia, Labriola Angela, Patruno Rosa, Ranieri Girolamo*

RISULTATI DEFINITIVI DEL PROGETTO DI RICERCA SULL'ENCEFALOPATIA SPONGIFORME FELINA. *Iulini Barbara, Porcario Chiara, Perazzini Alice Zaira, Castagnaro Massimo, Mandara Maria Teresa, Ligios Ciriaco, Loria Ruggero Guido, Cantile Carlo, Caramelli Maria, Casalone Cristina*

MENINGOENCEFALITE GRANULOMATOSA DA PROTOHECA IN UN CANE. *Salvadori Claudia, Mandrioli Luciana, Giuliano Bettini, Arispici Mario, Cantile Carlo*

INFEZIONE SPERIMENTALE CON *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* NELLA LEPRE. *Verin Ranieri, Ambrogi Cecilia, Fratini Filippo, Ebani Valentina Virginia, Ragagli Charlotte, Poli Alessandro*

UN CASO DI CEFALOTORACOPAGIA (*OCTOPUS BIARITUS*) NELL'AGNELLO. *Giuliano Bettini, Giuseppe Sarli, Barbara Bacci, Paolo Stefano Marcato*

IPERPLASIA CISTICA DELLA CISTIFELLEA IN UN CANE. *Annachiara Vinci, Barbara Brunetti, Antonella Mazzi, Giuseppe Sarli*

CORRELAZIONE TRA IL TEST TRAP-ELISA E L'IMMUNOISTOCHEMICA PER TERT NELLA DETERMINAZIONE DELLA TELOMERASI NEI TESSUTI MAMMARI DI GATTA. *Panarese Serena, Fusaro Laura, Brunetti Barbara, Benazzi Cinzia, Sarli Giuseppe*

MICOSI INVASIVA INTRATORACICA IN UN GIOVANE CANE: ASPETTI CLINICI ED ANATOMOPATOLOGICI. *Pascotto Ernesto, Troi Angelo, Pittioni Eugenio, Galeotti Marco*

PATTERNS DI GLICOSILAZIONE DELLA α 1- GLICOPROTEINA ACIDA IN GATTI CLINICAMENTE SANI POSITIVI A CORONAVIRUS FELINO. *Cecilian Fabrizio, Prina Alessandra, Pocacqua Vanessa, Miranda Ribeira Alba, Paltrinieri Saverio*

INDAGINE RETROSPETTIVA SULLA SIEROPOSITIVITÀ PER ORTHOMIXOVIRUS TIPO A NEL GATTO. *Paltrinieri Saverio, Spagnolo Valentina, Giordano Alessia, Moreno Martin Ana, Luppi Andrea*

ESPRESSIONE DELLA CICLOOSSIGENASI-2 NEL CARCINOMA SQUAMOCELLULARE DEL CANE E DEL GATTO. *Millanta Francesca, Corazza Michele, Lorenzi Davide, Poli Alessandro*

IN RICORDO DI ROSARIO PREZIOSI

L'amico e collega Rosario Preziosi, nato a Cremona il 18 febbraio 1962, da 16 anni è stato parte integrante ed attiva della nostra Società Scientifica. Si è laureato nel 1990 presso l'allora Istituto di Patologia Generale ed Anatomia Patologica Veterinaria con una tesi dal titolo "L'indagine automatica di immagine come test diagnostico e prognostico nelle neoplasie cutanee del cane". Ha conseguito il titolo di dottore di ricerca in Discipline anatomoistopatologiche veterinarie nel 1994 discutendo una tesi al titolo "L'attività proliferativa cellulare in oncologia veterinaria: indagini istochimiche ed immunoistochimiche" e, dopo un periodo di precariato durato 5 anni che l'ha visto come laureato frequentatore prima, come borsista post-dottorato poi ed infine di nuovo come laureato frequentatore, durante il quale non ha mai perso il suo entusiasmo per l'attività di ricerca che seguiva con passione e dedizione, è approdato, nel 1999, al ruolo di ricercatore universitario inquadrato nel nostro settore scientifico. L'ultimo riconoscimento accademico, pienamente meritato e che deve essere ricordato, è l'idoneità a professore associato conseguita lo scorso novembre presso la Facoltà di Medicina Veterinaria di Padova.

Tre qualità dell'amico Rosario sono e saranno sempre vive nella nostra memoria: il suo contributo all'attività didattica, la dedizione verso la ricerca, ma soprattutto la generosità e l'altruismo che dominavano il suo atteggiamento verso gli altri. Queste tre qualità trovavano spesso ampie sovrapposizioni e di ciò vi è stata viva testimonianza dei numerosi studenti e colleghi giunti da diverse sedi nazionali la mattina dell'ultimo saluto all'amico, al docente, all'uomo di scienza. L'attività didattica, iniziata con il conferimento di insegnamenti ufficiali sin dal 2000, l'ha visto titolare degli insegnamenti di Metodologia diagnostica e morfofisiologia veterinaria, Patologia generale veterinaria, e da 4 anni, presso la nostra sede di Cesenatico, dei corsi di Patologia Generale ed ittiopatologia e dell'anatomia patologica dei prodotti ittici. L'attività di ricerca, oggi documentata da numerose pubblicazioni a stampa, ha portato contributi nel campo dell'oncologia dei piccoli animali, della patologia gastrointestinale degli animali da reddito ed ultimamente, in funzione dell'attività di diagnostica dermatologica che lui seguiva e della attività didattica su Cesenatico, la sua produzione scientifica era particolarmente indirizzata verso la dermatologia e la patologia degli elasmobranchi. Erano ormai in fase conclusiva uno studio sulla linfangiogenesi nel mastocitoma del cane ed un lavoro, inviato al Veterinary Pathology, sulle malformazioni scheletriche di elasmobranchi.

Dell'amico Rosario va infine ricordata la sua molteplicità di interessi anche verso attività extrauniversitarie, nei confronti delle quali si poneva sempre con livelli di elevata professionalità. E' infatti da ricordare, nell'attività agonistica della scherma, il suo ruolo di maestro nazionale di sciabola, che svolgeva da oltre quindici anni, seguendo con passione e dedizione i suoi allievi negli allenamenti e nelle trasferte da cui sono scaturite posizioni d'eccellenza in campionati nazionali e internazionali, come i due recenti titoli italiani di campione nazionale ed una partecipazione al campionato mondiale.

La generosità e l'altruismo che dominavano il suo rapporto con gli altri lasciano oggi in tutti noi un vuoto colmabile solo con il suo vivo ricordo nelle nostre menti.

Pisa, 12.05.07

I colleghi di Bologna

FARMACI CITOTOSSICI E TOSSICITA' CARDIACA

Giusti Anna Maria

*Preclinical Development - Pathology, Nerviano Medical Sciences - viale Pasteur 10 - 20014
Nerviano (Mi) – Italy*

La tossicità cardiaca che può comparire durante il trattamento con diversi farmaci antitumorali citotossici, può costituire un fattore limitante il dosaggio del farmaco nel trattamento di tumori, riducendo perciò le possibilità di risposta al trattamento. Inoltre la cardiotoxicità può anche essere responsabile di effetti collaterali a lungo termine, con un'incidenza elevata in pazienti sopravvissuti al tumore. Questi effetti collaterali possono essere particolarmente gravi nei pazienti pediatrici, vista la lunga aspettativa di sopravvivenza una volta superato l'evento neoplastico. La tossicità cardiaca può essere un evento raro con alcuni farmaci antitumorali, ma può presentarsi con un'alta incidenza, sino a più del 20%, in pazienti trattati con antracicline quali la doxorubicina. Altri farmaci antitumorali responsabili di episodi di tossicità cardiaca sono rappresentati da 5-fluorouracile e capecitabina, ciclofosfamide, agenti alchilanti quali il cisplatino, taxoidi quali il paclitaxel e nuovi farmaci quali l'anticorpo monoclonale trastuzumab, utilizzato nella terapia del tumore al seno.

Le antracicline sono la classe più studiata di antitumorali citotossici in grado di causare cardiomiopatia, insufficienza cardiaca congestizia ed alterazioni elettrocardiografiche con comparsa sia precoce che tardiva. Nell'uomo sono stati segnalati casi di cardiotoxicità insorta sino a 20 anni dopo il completamento di cicli di terapie con antracicline. Verranno qui descritte le alterazioni cardiache istologiche ed ultrastrutturali osservabili a seguito di trattamento con antracicline, i potenziali meccanismi d'azione che le possono indurre (produzione di radicali liberi, induzione di apoptosi, sintesi di ceramide, alterazioni nell'omeostasi del calcio e del ricambio intracellulare del ferro) ed i marker biochimici di danno cardiaco che possono essere utilizzati in clinica (quali troponina e peptidi natriuretici). Verranno infine illustrati alcuni modelli animali utilizzati per predire eventuali effetti cardiotoxici di nuove molecole antitumorali, per lo studio di farmaci da utilizzarsi in combinazione nella terapia antitumorale e per lo studio di nuovi farmaci cardioprotettivi.

Keywords: cardiotoxicità, terapia antitumorale, antracicline, doxorubicina

CYTOTOXIC DRUGS AND CARDIOTOXICITY

Cardiotoxicity occurs during therapy with several cytotoxic drugs and may be dose limiting factor in cancer treatment and hence in tumor response. Furthermore, cardiotoxicity can also be responsible for long term side effects and may cause severe morbidity in surviving cancer patients, which may be relevant especially in pediatric oncology. Cardiotoxicity is rare with some agents, but may occur in a high prevalence, up to > 20% of patients treated with anthracyclines.

Cytotoxic drugs which have shown to have cardiotoxic liabilities include 5-fluorouracil, capecitabine, mitoxantrone, cisplatin (alkilating agent), taxoids such as paclitaxel and docetaxel, and newer drugs such as the monoclonal antibody trastuzumab used for breast cancer.

Anthracyclines have been reported to cause cardiomyopathy, congestive heart failure and ECG alterations. Both early and late onset cardiac effects are reported. Late onset effects can occur up to 20 years after completion of anthracycline therapy.

Histological and ultrastructural features of anthracycline cardiotoxicity will be described, together with potential mechanism of action (free radical generation, induction of apoptosis, synthesis of ceramide, abnormalities in Ca²⁺ homeostasis and intracellular iron turnover) and biochemical markers of cardiac damage (such as Troponin and Natriuretic Peptides). Animal models predictive of human cardiotoxicity to be used for toxicological screening of new analogs, to study drug combination and cardioprotective agents will be described.

Keywords: cardiotoxicity, anticancer therapy, anthracyclines, doxorubicin

ASPETTI DERMATOPATOLOGICI ED IMMUNOPATOGENETICI DELL'INFEZIONE DA LEISHMANIA

Brachelente Chiara

Dipartimento di Scienze Biopatologiche ed Igiene delle Produzioni Animali ed Alimentari – Università degli Studi di Perugia

La leishmaniosi è una zoonosi endemica nel bacino del mediterraneo causata da un protozoo intracellulare obbligato del genere *Leishmania*, trasmesso da insetti della famiglia Phlebotominae. Nell'ospite intermedio vertebrato (uomo, canidi, roditori), il parassita è presente in uno stadio di sviluppo aflagellato (amastigota) nel citoplasma di cellule del sistema dei fagociti mononucleati. La malattia è caratterizzata dalla comparsa di lesioni cutanee, linfadeno- ed epatosplenomegalia, perdita di peso, lesioni oculari ed insufficienza renale e può avere esito infausto. Il quadro dermatologico è rappresentato da una dermatite esfoliativa generalizzata e non pruriginosa e da alopecia, nella quale la presenza di scaglie aderenti amiantacee ed argentee rappresenta un elemento distintivo. In associazione all'alopecia, e man mano che la malattia progredisce, possono svilupparsi lesioni nodulari ed ulcerazioni multifocali. Istologicamente, nelle biopsie cutanee, si osserva un infiltrato perivasale dermico caratterizzato prevalentemente da macrofagi, linfociti e plasmacellule. In alcuni casi l'infiltrato ha una distribuzione nodulare periannessiale. Nel citoplasma dei macrofagi è possibile riconoscere la presenza di amastigoti quali strutture rotondeggianti, con nucleo basofilo ed alone perinucleare. La patogenesi della malattia è complessa e lo stato immunitario dell'ospite svolge un ruolo fondamentale nel determinismo e nell'evolversi dell'infezione. Una risposta immunitaria anticorpale non conferisce protezione dalla malattia ed anzi può aggravarla a causa del danno sistemico prodotto dalla presenza di complessi immuni circolanti. Al contrario, lo sviluppo di una risposta prevalentemente cellulo-mediata è associato alla risoluzione dell'infezione. In effetti, come altri batteri e parassiti intracellulari, *Leishmania* è in grado di infettare macrofagi ed attivare cellule natural killer, scatenando una risposta immunitaria mediata da cellule Th1. Studi effettuati nell'uomo ed in modelli sperimentali murini hanno dimostrato che le cellule T helper 1 (Th1), producendo citochine quali interferon- γ (IFN- γ), fattore di necrosi tumorale- α (TNF- α) ed interleuchina-2 (IL-2), conferiscono protezione nei confronti del parassita mentre le cellule Th2, che producono citochine quali IL-4 e IL-10, sono responsabili della progressione dell'infezione e della malattia. Nella specie canina, la dicotomia tra risposta Th1 e Th2 nelle diverse forme della malattia non è ben chiara poiché i dati derivanti dagli studi sulla risposta immune in corso di leishmaniosi nel cane sono scarsi ed incostanti. In alcuni studi è stato dimostrato che la resistenza a *L. infantum* nel cane è associata alla presenza di bassi titoli di anticorpi anti-*Leishmania* e alla produzione di IL-2 e TNF- α , confermando l'attivazione di una risposta di tipo Th1. Altri studi, effettuati per determinare il livello di citochine nel supernatante di cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) provenienti da animali asintomatici, hanno rivelato una overespressione di citochine quali TNF- α e IL-2 in cani asintomatici rispetto ad animali sintomatici e non infetti. Tuttavia, studi ulteriori riguardanti la risposta immunitaria sistemica (PBMC) e locale (cute ed organi interni) in corso di leishmaniosi sono di fondamentale importanza ai fini di una maggiore comprensione dei meccanismi patogenetici della malattia, della prognosi e della terapia.

Parole chiave: cane, leishmaniosi, risposta immune, citochine, cute

DERMATOPATHOLOGY AND IMMUNOPATHOGENETIC FEATURES OF LEISHMANIA INFECTION

Leishmaniasis is a vector-borne disease caused by obligate intracellular protozoa of the genus *Leishmania*, transmitted by sandflies of the family Phlebotominae. In the intermediate vertebrate host (men, dogs, rodents) the parasite is found as a non-flagellate stage in the cytoplasm of macrophages. The disease causes skin lesions, lymphadenomegaly and hepatosplenomegaly, weight loss, ocular lesions and renal failure, and can have a fatal outcome. The skin lesions are characterized by a nonpruritic, generalized, exfoliative dermatitis with alopecia. The presence of silvery, asbestos-like, adherent scales is a distinctive feature. As the disease progresses, nodular lesions and multifocal ulcerations can develop. The histopathology of skin biopsies shows a superficial to deep dermal perivascular infiltration characterized by a high number of macrophages with fewer lymphocytes and

plasma cells. Occasionally the inflammation is oriented nodularly around the adnexal structures. Variable numbers of *Leishmania* amastigotes are visible in the cytoplasm of macrophages as round structures with a basophilic nucleus and a peripheral halo. The pathogenesis of leishmaniasis is complex and the immune state of the host plays a key role in the development and in the evolution of the infection. An antibody mediated immune response does not protect from the disease and is, in fact, detrimental, due to the systemic damage caused by the circulating immune complexes. On the other hand, the development of a cell-mediated immune response can lead to the successful resolution of the infection. In fact, similar to other intracellular bacteria and parasites, *Leishmania* can infect macrophages and activate natural killer cells, mounting a Th1 cell mediated immune response. Several studies in humans and murine models indicated that the prevailing production of IFN- γ , TNF- α , and IL-2 by the Th1 cells is associated to protection from the infection. In contrast, the prevailing production of IL-4 and IL-10 by the Th2 cells is responsible for the progression of the infection and of the disease. In the dog, the Th1/Th2 dichotomy is not clear in the different forms of the disease, since the data available from studies of the immune response in canine leishmaniasis are scarce and fragmented. In some studies it has been demonstrated that the resistance to *L. infantum* in the dog is associated with low anti-*Leishmania* antibody levels and with the production of IL-2 and TNF- α , substantiating a Th1 cell mediated immune response activation. Other studies, investigating cytokine expression by PBMC from asymptomatic animals, have reported an overexpression of cytokines such as TNF- α and IL-2 in asymptomatic dogs, compared with symptomatic and control uninfected dogs. However, further studies on the systemic (PBMC) and local (skin or other organs) immune response to *Leishmania* are needed in order to achieve a better understanding of the pathogenetic mechanisms of the disease as these may have important implications for prognosis, therapy and vaccine development.

Keywords: canine, leishmaniasis, immune response, cytokines, skin

LESIONI EPATICHE INDOTTE DA UN INIBITORE DELLA TIROSINA-FOSFATASI NEL CANE

Marozin Cristiano, Ardizzone Michele, Carbonatto Michela, Peano Sergio

Pathology Unit-RBM Saronno, Via Ribes 1, Colletterto Giocosa 10010, Italia

Il diabete di tipo II è caratterizzato da resistenza all'insulina. L'inibizione dell'attività di PTP1B ha come risultato la stimolazione del signaling del recettore dell'insulina, con un aumento della sensibilità all'insulina e del metabolismo del glucosio.

Il composto X, un inibitore della tiroxina fosfatasi per il diabete di tipo II, ha indotto tossicità epatica nel cane, in uno studio della durata di 4 settimane alla dose di 200 mg/kg/day.

La tossicità epatica è determinata dalla presenza di pigmenti (di origine biliare), proliferazione dei dotti biliari, necrosi cellulare. Si è inoltre osservata la presenza di vacuolizzazioni a livello della corteccia surrenale.

Essendo il margine di sicurezza considerato non accettabile, lo sviluppo preclinico di questa molecola è stato bloccato.

Questo effetto non è stato osservato allo stesso modo nel ratto (lo studio di 4 settimane alla dose massima di 1500 mg/kg/day ha evidenziato soltanto effetti di tipo clinico trascurabili, come aumento della SAP, ma non evidenze morfologiche di danno epatico).

Parole chiave: diabete, recettore per l'insulina, inibitore della tiroxina fosfatasi, tossicità epatica

HEPATIC LESIONS INDUCED BY A TYROSINE-PHOSPHATASE INHIBITOR IN DOGS

Type II diabetes is characterized by resistance to insulin. Inhibiting PTP1B activity results in stimulation of insulin receptor signaling, enhances insulin sensitivity and improves glucose metabolism.

Compound X, a tyrosine-phosphatase inhibitor for type II diabetes, induced liver toxicity in 4-week subchronic study in dogs at the dose of 200 mg/kg/day.

Liver toxicity was shown by marked presence of pigments (of biliary origin), bile duct proliferation, necrotic cells. Vacuolation of the inner cortex in adrenal glands was also observed.

Due to an unacceptable safety margin, the preclinical development of this molecule was discontinued.

This effect was not comparably seen in rats (4 weeks toxicological study up to 1500 mg/kg/day only showed marginal clinical effects, such as SAP increase, but not morphological evidence of liver impairment).

Keywords: diabetes, insulin receptor, tyrosine-phosphatase inhibitor, liver toxicity

SVILUPPO TOSSICOLOGICO DI PRODOTTI DA UTILIZZARE NELLA DIETA PER IL CONTROLLO DELL'APPETITO

Argentino Storino Alberta, Andreini Isabella, Mattei Eleonora

RTC - Research Toxicology Centre – Via A. Tito Speri, 12 – Pomezia (Roma), Italy

Scopo di questa presentazione è descrivere l'approccio adottato nella definizione dei disegni sperimentali, applicati nello sviluppo tossicologico di prodotti da utilizzare nella dieta per il controllo dell'appetito. Sono stati effettuati studi rispondenti alle richieste regolatorie standard, tuttavia sono state appropriatamente disegnate attività investigative aggiuntive, per meglio inquadrare alcuni effetti dal punto di vista tossicologico e farmacologico.

L'obesità è considerata una delle più importanti cause di morbidità e mortalità nel 21^{mo} secolo e nei paesi occidentali industrializzati. I meccanismi fisiologici che regolano il consumo di cibo e, conseguentemente, l'incremento di peso corporeo, sono molto complessi e non completamente chiariti. Tuttavia, la comprensione dei fenomeni che stanno alla base di tali meccanismi è incrementata enormemente nell'ultima decade. Centri cerebrali regolano l'omeostasi energetica e specifici equilibri ormonali influenzano i circuiti che modulano i meccanismi di stimolazione dell'appetito o, al contrario, di sensazione di sazietà. Nuovi prodotti sono in studio che agiscono sull'asse ipotalamo-intestino per la regolazione dell'appetito, rappresentando un interessante approccio terapeutico dell'obesità.

Parole chiave: controllo appetito, obesità, peso corporeo

TOXICOLOGICAL DEVELOPMENT OF PRODUCTS TO BE USED FOR APPETITE CONTROL

The aim of the present work is to describe our approach in defining the experimental designs for toxicological studies, during the pre-clinical development of products, which are intended to be used as food ingredients for appetite control. GLP-compliant, regulatory studies have been implemented with specific additional investigations, in order to discriminate between the pharmacological activity (food intake and body weight decrease) and toxicological effects.

Obesity is one of the most important metabolic diseases and it is set to be the largest single cause of mortality and morbidity in the 21st century and in industrialised western countries. The complex physiological mechanisms involved in food consumption control and body weight gain are not completely understood yet, even though the identification of the key mechanisms underlying these phenomena has highly improved in the last decade. Brain nuclei regulate the energy homeostasis, while specific hormone equilibrium plays a central role in stimulating or suppressing the hunger stimuli or satiety feeling. Pharmacological research is presently focusing on the discovery and development of new drugs, which act on the hypothalamus-gut axis to regulate the appetite stimulus. These new drugs represent an interesting therapeutic approach to obesity.

Keywords: appetite control, obesity, bodyweight

LA VALUTAZIONE ISTOPATOLOGICA DEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE NEGLI STUDI DI TOSSICOLOGIA GENERALE SU COMPOSTI POTENZIALMENTE NEUROTOSSICI: LIMITI DELLE PROCEDURE ATTUALI E NUOVE PROPOSTE METODOLOGICHE

Lanzoni Anna, Cristofori Patrizia

Safety Assessment Dept. Histopathology Medicine Research Center – GlaxoSmithKline, via A. Fleming, 4 – Verona, Italia

Negli studi di tossicologia generale su specie precliniche (roditore, cane, scimmia), la valutazione istopatologica del sistema nervoso centrale viene generalmente condotta su un numero limitato di sezioni di cervello e di midollo spinale, fissati per immersione in formalina al 10% tamponata, inclusi in paraffina e colorati con ematossilina-eosina. Questo approccio è ritenuto valido e sufficiente per la valutazione del sistema nervoso centrale negli studi di tossicologia generale per evidenziare eventuali lesioni legate al trattamento con composti e soddisfa quanto richiesto dalle agenzie regolatorie. Tuttavia tale approccio può risultare non completamente esaustivo nel caso in cui si valutino composti con potenziale neurotossico. Infatti un'analisi istopatologica del sistema nervoso centrale condotta secondo le procedure standard può portare a risultati falsamente negativi o falsamente positivi, legati ad esempio a un campionamento inadeguato o alla presenza di artefatti. In questo lavoro vengono evidenziati i limiti dell'approccio standard alla valutazione istopatologica del sistema nervoso centrale nelle specie precliniche e proposte nuove procedure istologiche, utilizzabili per la valutazione di una eventuale neurotossicità nelle specie sopra riportate.

Parole chiave: sistema nervoso centrale, neurotossicità, istologia

HISTOPATHOLOGICAL EVALUATION OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM IN GENERAL TOXICOLOGY STUDIES ON POTENTIALLY NEUROTOXIC COMPOUNDS: LIMITS OF CURRENT HISTOLOGICAL PRACTICES AND PROPOSAL FOR NEW METHODOLOGICAL APPROACHES

The histopathological evaluation of the central nervous system in preclinical species (rodents, dog, non-human primate) from general toxicology studies, is usually performed on a limited number of sections from the brain and spinal cord, fixed by immersion in 10% buffered formalin, paraffin embedded and haematoxylin-eosin stained. This approach is considered valid and sufficient to fulfil also regulatory authorities' requests. However this could be not exhaustive in the evaluation of potentially neurotoxic compounds. In fact, the histopathological evaluation of the central nervous system according to such standard procedures could provide false positive or false negative results, due to inadequate sampling or to artifactual conditions. Aims of this presentation are to highlight the limits of standard approach to histopathological evaluation of the central nervous system in preclinical species and to propose new histological procedures for the evaluation of potential neurotoxicity in the aforementioned species.

Keywords: central nervous system, neurotoxicity, histology

LA VALUTAZIONE DELL'APPARATO RIPRODUTTORE MASCHILE NEL CANE BEAGLE NEGLI STUDI DI TOSSICOLOGIA GENERALE: USO E UTILITA' DI INDAGINI COLLATERALI *IN VIVO*

Cavaliere Luca, Lanzoni Anna, Cristofori Patrizia

*Safety Assessment Dept. Histopathology Medicine Research Center – GlaxoSmithKline, via A.
Fleming, 4 – Verona, Italia*

La valutazione della tossicità di nuovi farmaci sull'apparato riproduttore maschile nel cane può risultare difficoltosa, per l'esiguità del numero di animali a disposizione, per il diverso livello di maturità sessuale degli stessi, per la presenza di quadri istopatologici dell'apparato riproduttore ascrivibili a background. Alcune indagini non invasive possono risultare di valido aiuto in tale contesto, consentendo la valutazione dello stato di maturazione degli animali prima della partenza dello studio e quindi una loro adeguata distribuzione nei diversi gruppi di trattamento. Inoltre, tali ausili permettono di valutare *in vivo* la comparsa di eventuali lesioni legate al trattamento con composti e seguirne lo sviluppo, corroborando l'esame istopatologico. L'ultrasonografia, permette di esaminare l'apparato riproduttore maschile a diversi livelli, mettendo in evidenza anomalie morfologiche nei testicoli, prostata, epididimi e dotti deferenti, grossi vasi. Anche l'esame del liquido seminale può risultare utile per la valutazione di parametri relativi alla funzionalità dell'apparato riproduttore maschile. Scopo del presente lavoro è evidenziare l'utilità di indagini collaterali quali l'ultrasonografia e l'esame del seme come validi strumenti diagnostici *in vivo* utili nell'analisi dell'apparato genitale maschile.

Parole chiave: apparato riproduttore maschile; cane, tossicità; ultrasonografia, esame seminale

THE EVALUATION OF THE MALE REPRODUCTIVE SYSTEM IN BEAGLE DOGS IN GENERAL TOXICOLOGY STUDIES: USE AND UTILITY OF COLLATERAL INVESTIGATIONS *IN VIVO*

The evaluation of toxicity of a new drug on the male Beagle dog reproductive system could be difficult. Actually, preclinical studies on the dog rely on a lower number of animals, often variable in their degree of sexual maturation, with histopathological findings compatible with background. Some non invasive investigations can result useful in this context, for example allowing the evaluation of the maturity of the animals before the beginning of the study and consequently their appropriate distribution throughout control and treated groups. Moreover, these tools allow an *in vivo* evaluation of possible lesion appearance caused by the treatment with some compounds and its development monitoring, corroborating histopathological evaluation. The ultrasonography, the most efficient tool, allows examining the male reproductive system at different levels, highlighting morphological abnormalities in the testis, prostate, epididymides, deferentes, large vessels. Semen analysis could be also useful to evaluate specific parameters related to the male reproductive system function. The aim of this work is to highlight the utility of *in vivo* collateral investigations like ultrasonography and fresh semen analysis in the evaluation of the male dog genital system from general toxicology studies.

Key words: male reproductive system; dog; toxicity; ultrasonography, semen analysis

STUDIO DELLE GIUNZIONI NEUROMUSCOLARI IN UN MODELLO MURINO DI SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA E VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DI UN TRATTAMENTO CRONICO CON ACETIL-L-CARNITINA

Pesce Daniela¹, Alfano Anna Maria¹, Agostini Patrizia¹, Onali Assunta¹, Perna Elisa¹,
De Angelis Clara¹, Lucreziotti Maria Rita¹, Carminati Paolo¹, Bendotti Caterina²

¹*Sigma-Tau Research and Development, Pomezia ITALY*; ²*Istituto di Ricerche Farmacologiche “Mario Negri”, Dipartimento di Neuroscienze, Milan ITALY*

La sclerosi laterale amiotrofica (SLA) è una gravissima patologia neurodegenerativa, a carattere progressivo e dall'esito fatale, caratterizzata dalla degenerazione dei motoneuroni, alla quale consegue la denervazione dei muscoli scheletrici. La correlazione tra l'alterazione dell'enzima Cu/Zn dipendente superossido dismutasi 1 (SOD1) e l'insorgenza della malattia è stata ormai stabilita in circa il 20% dei casi di sclerosi laterale amiotrofica familiare. I topi transgenici TgSOD1 G93A, portatori del gene umano SOD1 mutato in G93A, sviluppano una patologia degenerativa progressiva che ripropone, almeno in parte, il quadro della SLA dell'uomo. La nostra ricerca era finalizzata alla caratterizzazione della neuropatia periferica, espressa nel modello, attraverso lo studio morfologico-morfometrico delle giunzioni neuromuscolari e, nel contempo, era volta alla valutazione di eventuali effetti indotti da un trattamento cronico per via orale con Acetil-L-Carnitina (alla dose di 100mg/Kg, per la durata di 10 settimane). La fase in vivo è stata condotta presso l'Istituto Mario Negri di Milano. I risultati ottenuti depongono a favore di un effetto positivo dell'Acetil-L-Carnitina sul sistema nervoso periferico dei topi TgSOD1 G93A, nel sostenere il branching, con un un sensibile incremento del numero dei punti di ramificazione delle terminazioni nervose all'interno di ogni placca motrice (NTBP, +42.19%) e lo sprouting del nervo motorio delle giunzioni neuromuscolari (ottenuto moltiplicando NTBP per il diametro massimo di ogni placca motrice, +55.23%, p<0.05).

Parole chiave: sclerosi laterale amiotrofica, giunzioni neuromuscolari, topo transgenico, acetil-L-carnitina

NEUROMUSCULAR JUNCTIONS IN A TRANSGENIC MURINE MODEL OF AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS: EFFECTS OF ACETYL – L- CARNITINE

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a serious, progressive and in the end, fatal, neurodegenerative disease, characterized by degeneration of motor neurons, followed by denervation of the skeletal muscle. The correlation between alteration of the Cu/Zn-dependent superoxide dismutase 1 (SOD1) enzyme and onset of the disease has by now been established in about 20% of cases of familial amyotrophic lateral sclerosis. Transgenic TgSOD1 G93A mice, carriers of the human SOD1 gene with a G93A mutation, develop a progressive degenerative pathology which repropose, at least in part, the ALS picture in man. Our research was aimed at a characterization of peripheral neuropathy, expressed in the model, through the morphological-morphometric study of the neuromuscular junctions and, at the same time, directed towards an evaluation of the possible effects induced by chronic oral treatment with Acetyl-L-Carnitine (at a dose of 100 mg/kg, over ten weeks). The in vivo phase was carried out at the Mario Negri Institute facilities, in Milan. The results of our study give evidence for a potentially positive effect of Acetyl-L-Carnitine on the peripheral nervous system of TgSOD1 G93A mice, improving both the “nerve terminal branch points” (NTBP, +42.19%) and the “sprouting index ” (NTBP multiplied by the endplate maximum diameter, +55.23%, p<0.05), at the neuromuscular junction site.

Keywords: amyotrophic lateral sclerosis, neuromuscular junctions, transgenic mice, acetyl-L-carnitine

L' α_1 -GLICOPROTEINA ACIDA (AGP) MODULA L'APOPTOSI SPONTANEA E INDOTTA DA STAUROSPORINA IN MONOCITI E NEUTROFILI BOVINI MEDIANTE I RESIDUI DI ACIDO SIALICO

Pocacqua Vanessa, Bronzo Valerio, Miranda-Ribera Alba, Lecchi Cristina, Sartorelli Paola, Scaccabarozzi Licia, Lodde Valentina.

Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Via Celoria 10, 20133 Milano

L' α_1 -glicoproteina acida (AGP) è una proteina di fase acuta fisiologicamente espressa nel sangue, con una concentrazione serica di 0,3-0,5 mg/ml. Dal punto di vista strutturale, l'AGP è una immunocalina, ovvero una proteina di trasporto che svolge anche funzioni immunomodulatorie. In questo lavoro abbiamo voluto studiare gli effetti della AGP bovina (boAGP) sull'apoptosi di monociti e granulociti, sia spontanea che sperimentalmente indotta da staurosporina, un potente inibitore delle proteine chinasi cellulari. Le cellule isolate sono state poste in coltura ed incubate per 24/48 ore con differenti concentrazioni di boAGP, purificata all'omogeneità da siero di sangue. Elevate concentrazioni di boAGP, simili a quelle che si riscontrano nel torrente circolatorio durante la risposta sistemica alla infiammazione, sono in grado di ridurre la velocità di apoptosi spontanea, che viene determinata indirettamente sulla base della valutazione dell'attività enzimatica di due enzimi coinvolti nella fase di esecuzione dell'apoptosi, la caspasi-3 e la caspasi-7. Risultati simili sono stati ottenuti anche negli esperimenti di apoptosi indotta da staurosporina.

Successivamente sono state approfondite le basi molecolari di questa attività di modulazione dell'apoptosi. In particolare, si è indagato se la rimozione dell'acido sialico potesse influenzare l'attività anti-apoptotica della boAGP. I residui di acido sialico terminale sono stati rimossi enzimaticamente e la proteina desialilata è stata utilizzata per studiare i suoi effetti sulla apoptosi.

I risultati ottenuti hanno evidenziato come la rimozione delle molecole di acido sialico terminale dalle catene oligosaccaridiche sia in grado di abolire completamente l'attività anti-apoptotica della boAGP, sia per quello che riguarda l'apoptosi spontanea che per quello che riguarda l'apoptosi indotta da staurosporina. Possiamo quindi concludere che l'effetto anti-apoptotico della boAGP, almeno per quello che riguarda il nostro modello, sia mediato dai residui terminali di acido sialico che sono esposti sulla superficie della proteina.

Parole chiave: AGP, apoptosi, monociti bovini, granulociti bovini

INTRODUZIONE

L'alfa-1-glicoproteina acida (AGP) o orosomucoide è una proteina sierica di fase acuta, sintetizzata principalmente dagli epatociti (Fournier T. et al., 2000), la cui concentrazione aumenta dalle due alle cinque volte in caso di infiammazione acuta. La sintesi e la glicosilazione dell'AGP sono indipendentemente regolate da citochine e glucocorticoidi. I diversi tipi di glicoforme variano in base allo stato fisiopatologico dell'organismo e i cambiamenti nella glicosilazione dell'AGP non sono visibili soltanto in caso di infiammazione acuta, ma anche in altre condizioni fisiopatologiche come la gravidanza, artrite reumatoide, cirrosi epatica ed epatite (Biou D. et al., 1991) (Wieruszkeski J.M. et al., 1988). E' probabile

che queste modificazioni influenzino le proprietà biologiche dell'AGP.

La funzione biologica di questa glicoproteina non è del tutto chiara, sebbene siano stati fatti molti esperimenti in vitro e in vivo. Fino ad oggi è noto che l'AGP è in grado di legare e trasportare molte molecole (Israili ZH. et al., 2001) e che ha un'attività di tipo anti-infiammatoria e immunomodulatorio. Inoltre, grazie ad omologie nei domini strutturali, l'AGP è stata classificata come appartenente alle immunocaline, una sottofamiglia delle lipocaline che modula le risposte immunitarie e infiammatorie (Logdberg L. et al., 2000).

L'AGP è una glicoproteina di 41-43 kDa con un alto contenuto in residui oligosaccaridici (45%) (Schmid K. et al., 1977), un'alta solubilità sia in acqua che in molti solventi organici polari ed un punto isoelettrico compreso tra 2,8 e 3,8.

In questo lavoro abbiamo voluto studiare gli effetti della AGP bovina (boAGP) sull'apoptosi di monociti e granulociti, sia spontanea che sperimentalmente indotta da staurosporina, un potente inibitore delle proteine chinasi cellulari. Si è cercato inoltre di valutare l'apporto della componente oligosaccaridica nell'attività pro- o anti-apoptotica della proteina.

MATERIALI E METODI

I monociti sono stati purificati a partire da sangue bovino sfruttando, nella prima parte, una procedura di tipo classico ed infine, per ottenere la maggior purezza della popolazione cellulare, la tecnica MACS CD14 MicroBeads. Per quanto concerne, invece, la popolazione dei granulociti neutrofili, essi sono stati ottenuti mediante metodica classica su gradiente di Percoll, previa esclusione dei soggetti che presentavano un'elevata percentuale di granulociti eosinofili.

Le cellule sono state piastrate in concentrazione di 10^5 per pozzetto e stimulate con concentrazioni di AGP pari a quelle fisiologiche (0,3 mg/ml) e di fase acuta (0,9 mg/ml). Tali valori sono stati decisi sulla base dei valori medi riportati in bibliografia (Eckersall et al., 2001; Horadagoda et al., 1999). L'effetto dell'AGP sull'apoptosi dei monociti è stato studiato utilizzando come modello l'attività di induzione dell'apoptosi da parte della Staurosporina (500 nM finale), inibitore della serina-chinasi ed è stata, inoltre, testata l'AGP in forma deglicosilata in concentrazione di fase acuta. Ciascuna condizione sperimentale è stata testata in triplicato. Gli esperimenti sono stati effettuati anche per la popolazione dei granulociti neutrofili in condizione di apoptosi spontanea. L'attività apoptotica è stata quantificata mediante un saggio di attività delle caspasi 3/7 che si basa sull'utilizzo di un substrato non fluorescente (Z-DEVD-R110). La quantità di fluorescenza generata dalla reazione risulta proporzionale alla quantità di caspasi 3/7 presente nel campione.

RISULTATI

I risultati ottenuti dagli esperimenti condotti sulla popolazione monocitaria hanno mostrato come la costimolazione delle cellule con l'induttore dell'apoptosi (staurosporina) e con la proteina in concentrazione di fase acuta evidenzia una attività anti-apoptotica da parte della boAGP. Gli stessi esperimenti sono stati condotti sui granulociti neutrofili in condizione di apoptosi spontanea e, anche in questo caso, è stata confermata l'attività anti-apoptotica della proteina in concentrazione di 0,9 mg/ml. È stata, inoltre, investigata l'importanza della componente oligosaccaridica nell'attività anti-apoptotica dell'AGP, grazie ad un processo di deglicosilazione della proteina mediante idrolisi con neuraminidasi, sui monociti bovini. In questo caso l'attività anti-apoptotica della proteina è stata totalmente inibita a conferma che la componente oligosaccaridica ha una valenza fondamentale nell'attività biologica della boAGP.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Elevate concentrazioni di boAGP, simili a quelle che si riscontrano nel torrente circolatorio durante la risposta sistemica alla infiammazione, sono in grado di ridurre la velocità di apoptosi spontanea, che viene determinata indirettamente sulla base della valutazione dell'attività enzimatica di due enzimi coinvolti nella fase di esecuzione dell'apoptosi, la caspasi-3 e la caspasi-7. Risultati simili sono stati ottenuti anche negli esperimenti di apoptosi indotta da staurosporina.

Successivamente sono state approfondite le basi molecolari di questa attività di modulazione dell'apoptosi. In particolare, si è indagato se la rimozione dell'acido sialico potesse influenzare l'attività anti-apoptotica della boAGP. I residui di acido sialico terminale sono stati rimossi enzimaticamente e la proteina desialilata è stata utilizzata per studiare i suoi effetti sulla apoptosi.

I risultati ottenuti hanno evidenziato come la rimozione delle molecole di acido sialico terminale dalle catene oligosaccaridiche sia in grado di abolire completamente l'attività anti-apoptotica della boAGP, sia per quello che

riguarda l'apoptosi spontanea che per quello che riguarda l'apoptosi indotta da staurosporina. Possiamo quindi concludere che l'effetto anti-apoptotico della boAGP, almeno per quello che riguarda il nostro modello, sia mediato dai residui terminali di acido sialico che sono esposti sulla superficie della proteina.

BIBLIOGRAFIA

1. Biou D, Bauvy C, N'Guyen H, Codogno P, Durand G, Aubery M., Clin Chim Acta. 1991 Dec 31;204(1-3):1-12.
2. Ceciliani, F., Grossi, C., Giordano, A., Pocacqua, V. and Paltrinieri, S. (2004) Vet. Immunol. Immunopathol. 99(3-4), 229-236.
3. Ceciliani, F., Pocacqua, V., Provasi, E., Comunian, C., Bertolini, A., Bronzo, V., Moroni, P. and Sartorelli, P. (2005) Vet. Res., 36(5-6),735-746.
4. Eckersall, P.D., Young, F.J., McComb, C., Hogarth, C.J., Safi, S., Weber, A., McDonald, T., Nolan, A.M., Fitzpatrick, J.L. (2001) Vet. Rec., 148, 35-41.
5. Fournier, T., Medjoubi-N, N. and Porquet, D. (2000) Biochim. Biophys. Acta., 1482(1-2), 157-171.
6. Horadagoda, N.U., Knox, K.M.G., Gibbs, H.A., Reid, S.W.J., Horadagoda, A., Edwards, S.E.R., Eckersall, P.D. (1999) Vet. Rec., 144, 437-441.
7. Israili ZH, Dayton PG., Drug Metab Rev. 2001 May;33(2):161-235.
8. Logdberg L, Wester L., Biochim Biophys Acta. 2000 Oct 18;1482(1-2):284-97.
9. Pocacqua, V., Provasi, E., Comunian, C., Paltrinieri, S., Gelain, E. and Ceciliani, F. (2005) Vet. Immunol. Immunopathol. 107(1-2),17-26.
10. Poland, D.C.W., Drenth, J.P.H., Rabinowitz, E., Livneh, A., Bijzet, J., van het Hof, B., van Dijk, W., (2001) Ann. Rheum. Dis. 60, 777-780.
11. Schmid K, Nimerg RB, Kimura A, Yamaguchi H, Binette JP., Biochim Biophys Acta. 1977 Jun 24;492(2):291-302.
12. Theilgaard-Mönch, K., Jacobsen, L.C., Rasmussen, T., Niemann, C.U., Udby, L., Borup, R., Gharib, M., Arkwright, P.D., Gombart, A.F., Calafat, J., Porse, B.T. and Borregaard, N. (2005) J. Leuk. Biol., 78(2), 462-470.
13. Wieruszkeski JM, Fournet B, Konan D, Biou D, Durand G., FEBS Lett. 1988 Oct 10;238(2):390-4.

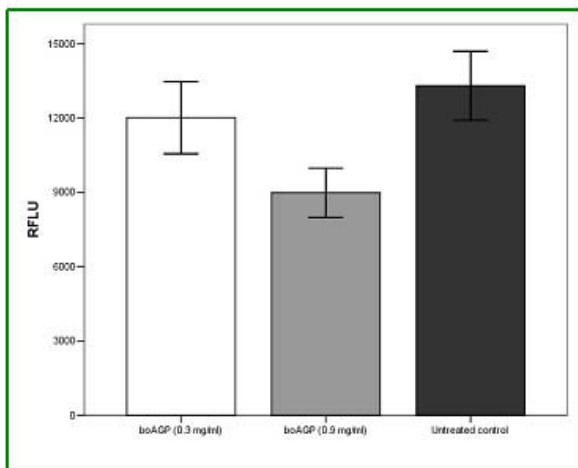


Figura 1. Attività della boAGP (0,3 e 0,9 mg/ml) in monociti bovini in condizione di apoptosi spontanea. Untreated control = cellule in apoptosi spontanea

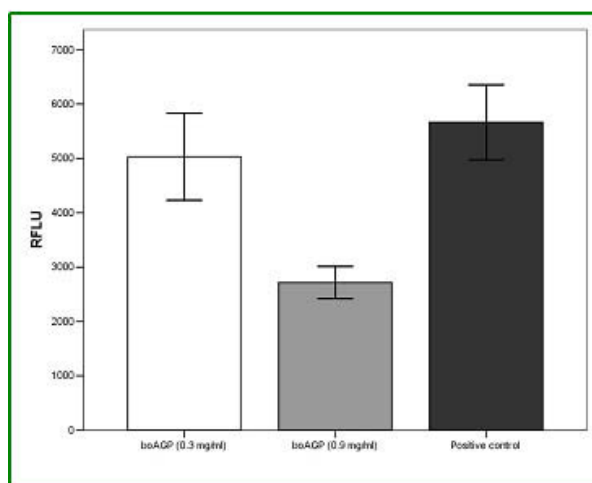


Figura 2. Attività della boAGP (0,3 e 0,9 mg/ml) in monociti bovini in condizione di apoptosi indotta mediante staurosporina (400 nM). Positive control = cellule trattate solo con 400 nM di staurosporina

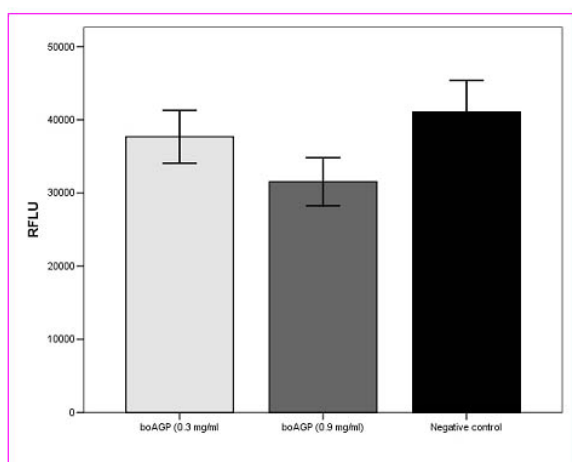


Figura 3. Attività della boAGP (0,3 e 0,9 mg/ml) in granulociti neutrofili bovini in condizione di apoptosi spontanea. Negative control = cellule in apoptosi spontanea

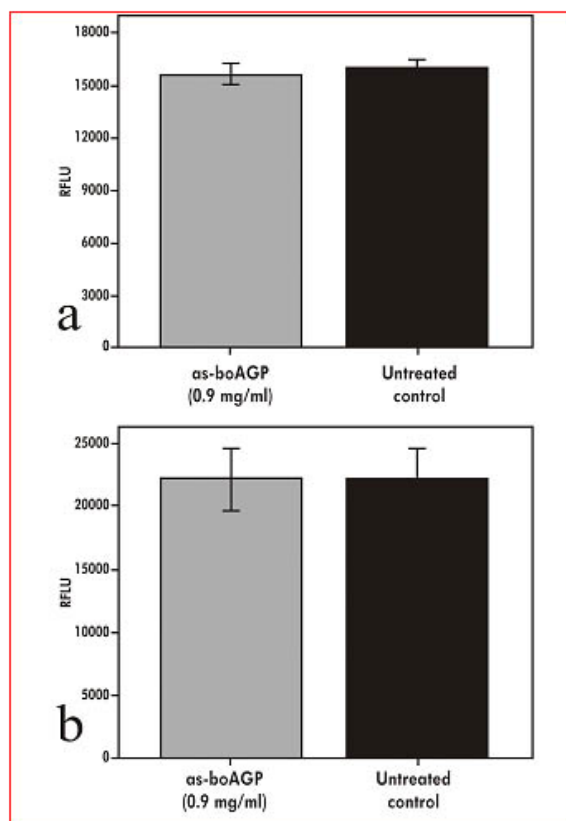


Figura 4. Attività della boAGP desialilata mediante neuraminidasi in concentrazione di 0,9 mg/ml in monociti bovini sia in condizione di apoptosi spontanea (a) che indotta da staurosporina (b)

**ALPHA1-ACID GLYCOPROTEIN MODULATES SPONTANEOUS AND
STAUROSPORINE-INDUCED APOPTOSIS IN BOVINE MONOCYTES AND
GRANULOCYTES BY MEANS OF SIALIC ACID TERMINAL RESIDUES**

α_1 -acid glycoprotein (AGP) is a normal constituent of bovine blood (0,3 – 0,5 mg/ml⁻¹). From a structural perspective AGP is an immunocalin, a binding protein that can also exert several immunomodulatory functions. In this communication we investigated the effect of bovine α_1 -acid glycoprotein (boAGP) on spontaneous and staurosporine (a potent protein kinase inhibitor)-induced apoptosis of some white blood cells, such as monocytes and granulocytes. When the cells are incubated with high concentrations of boAGP, similar to those found in plasma during systemic reaction to inflammation, their spontaneous apoptosis rate was reduced, as determined by caspase-3/-7 enzymatic activity assay. Similar results were obtained when apoptosis was induced by adding of staurosporine. We also investigated whether this apoptosis-modulating activity of boAGP was dependent on the terminal sialic acid residues exposed on the surface of the protein. Enzymatic treatment with neuraminidase, that cleaves terminal sialic acid residues, completely abolished boAGP' anti-apoptotic activity. It can be therefore speculated that the protective effect of AGP is probably mediated by its sialic acid terminal groups.

Key words: AGP, apoptosis, bovine monocytes, bovine granulocytes.

ESPRESSIONE DI HEAT SHOCK PROTEINS (HSPS) IN CORSO DI PATOLOGIE VIRALI DEL SUINO

Rondena Marco¹, Gelmetti Daniela², Riccaboni Pietro¹, Giudice Chiara¹, Finazzi Mario¹

¹: Sezione di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviare, Polo Universitario di Lodi, Facoltà di Medicina Veterinaria, Milano. ²: Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia, Laboratorio di Istologia, Sezione di Milano.

Nello studio dei meccanismi di immunità naturale le HSPs sembrano svolgere compiti cruciali, non ancora del tutto chiariti, sia nelle prime fasi della risposta immunitaria (reclutamento dei linfociti T), sia nelle fasi più avanzate (mantenimento dell'omeostasi cellulare, immunoregolazione). E' inoltre importante notare che le HSPs sono filogeneticamente molto correlate, essendo espresse in procarioti e eucarioti. Abbiamo precedentemente illustrato i risultati relativi all'espressione di HSP72/73, in reni di suini colpiti da patologie virali (PCV2/PRRSV) e negativi per patologie batteriche (*Leptospira* spp., *Streptococcus* spp.). Nella presente segnalazione nei medesimi soggetti viene indagata l'espressione immunoistochimica coordinata di HSP 72/73 ed HSP 60, in correlazione con lo stadio del processo infiammatorio, in reni, fegato ed organi linfoidi. L'espressione di HSP72/73, ha correlazione positiva con la cronicizzazione del processo infiammatorio e la positività sembra essere specifica per il citoplasma ed il nucleo delle cellule epiteliali. L'espressione di HSP 60 risulta esclusivamente citoplasmatica sia nelle cellule epiteliali che in cellule deputate alla presentazione antigenica nei follicoli splenici e linfonodali. Positività talora intensa si rileva inoltre nel citoplasma di cellule macrofagiche in piccoli focolai necrotici presenti in corso di PCV2. Questi dati sembrano confermare quanto riportato in bibliografia riguardo la funzione di HSP60 di reclutamento immunitario e di presentazione antigenica, in associazione ad MHCII. Ulteriori ed approfondite indagini, mediante metodiche molecolari, permetteranno di stabilire con maggiore precisione il ruolo di queste fondamentali proteine nei complessi meccanismi dell'immunità naturale.

Parole chiave: suino, PCV2, PRRSV, HSP, immunopatologia

INTRODUZIONE

Negli ultimi anni lo studio dei meccanismi che regolano l'immunità naturale sta assumendo sempre maggiore interesse sia in campo umano, in cui l'applicazione pratica è rivolta alla cura ed alla prevenzione delle patologie autoimmunitarie, sia in medicina veterinaria, in cui si assiste ad un aumento del numero degli studi riguardanti la tipizzazione della flogosi in corso di patologie ad eziologia infettiva negli animali da reddito. Tali studi sono volti a determinare sia il tipo cellulare coinvolto, sia il corredo citochinetico responsabile dell'insorgenza dei sintomi e della guarigione dell'animale. In questi ambiti, le proteine della classe delle Heat Shock Proteins (HSPs) sembrano svolgere compiti cruciali, benché non ancora del tutto chiariti¹. Tali proteine, in particolare, hanno una duplice funzione intervenendo sia nelle prime fasi della risposta immunitaria (reclutamento dei linfociti T), sia nelle fasi più avanzate (mantenimento

dell'omeostasi cellulare, immunoregolazione)². E' inoltre importante notare che le HSPs sono filogeneticamente molto correlate e che vengono espresse sia dai procarioti che dagli eucarioti³. Un'ultima considerazione merita il fatto che, anche per la notevole conservazione filogenetica, queste proteine possono condurre all'insorgenza di fenomeni autoimmunitari, come avviene per l'artrite reumatoide nell'uomo¹⁻³⁻⁴.

Scopo del lavoro: In una recente comunicazione congressuale⁵ abbiamo illustrato i risultati relativi all'espressione di HSP72/73 in reni di suini colpiti da patologie virali (PCV2/PRRSV) e negativi per patologie batteriche (*Leptospira* spp., *Streptococcus* spp.). Nella presente segnalazione viene indagata, nei medesimi soggetti, l'espressione immunoistochimica coordinata di HSP 72/73 ed HSP 60 in reni, fegato ed organi linfoidi.

MATERIALI E METODI

Campioni di reni, fegato, milza, linfonodi provenienti da 37 suini, tutti positivi per PRRSV (26 dei quali anche per PCV2) e negativi per agenti batterici quali *Leptospira* spp., *Streptococcus* spp., ecc., fissati in formalina ed inclusi in paraffina, sono stati selezionati dall'archivio del Laboratorio di Istologia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia. Da questi campioni sono state ricavate sezioni microtomiche seriate dello spessore di 4 μ m. Le sezioni sono state poi colorate con Ematossillina – Eosina e indagate immunohistochimicamente (metodo ABC, cromogeni DAB – AEC) utilizzando anticorpi primari monoclonali anti HSP72/73, HSP 72, HSP 60 (Stressgen) ed anticorpo policlonale anti – CD3 (DAKO).

RISULTATI

Le lesioni più gravi osservate sono state a carico dei reni, in cui si sono rilevate da glomerulonefrite membranosa – proliferativa a glomerulosclerosi e nefrite interstiziale linfoplasmacellulare fino a grave diffusa nefrosclerosi in associazione a necrosi tubulari multifocali. A carico del fegato sono stati osservati piccoli focolai necrotici sparsi, mentre una moderata deplezione linfoide era evidente in milza e linfonodi mesenterici. Immunohistochimica: I due anticorpi anti - HSP72/73 ed anti HSP72 non hanno mostrato differenze nei pattern distributivi con una netta positività a livello citoplasmatico e nucleare negli epitelii tubulari renali ed in minor misura negli endoteli e nella parete vasale nonché in sparsi elementi cellulari degli aggregati infiammatori con correlazione positiva con la cronicizzazione del processo infiammatorio (fig. 1). L'espressione di HSP 60 è risultata esclusivamente citoplasmatica nelle cellule epiteliali tubulari renali (fig. 2) e negli epatociti. In particolare, a livello renale, le positività più intense sono state rilevate in tubuli in prossimità di aggregati linfoplasmacellulari di dimensioni maggiori (aree di flogosi attiva, fig. 3). Notevole positività è stata riscontrata anche nel citoplasma di endoteli vasali e di cellule

infiammatorie morfologicamente riconducibili a macrofagi. Attraverso la colorazione combinata con HSP60 e CD3 è stato infine possibile evidenziare, sia negli aggregati linfocitari a livello dei focolai flogistici sia nei follicoli degli organi linfoidi esaminati, una prevalente disposizione centrale delle cellule positive per HSP60 (morfologicamente riconducibili a macrofagi), circondate, perifericamente, da numerosissimi linfociti T (CD3+/HSP60-, fig. 4).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

Dai risultati ottenuti emerge come HSPs 72/73 abbiano un pattern distributivo sia citoplasmatico che nucleare soprattutto a livello delle cellule epiteliali, confermando il loro ruolo chaperonico di mantenimento e ripristino dell'omeostasi cellulare⁶. L'espressione di HSP60, al contrario, sembra avere una notevole specificità citoplasmatica, sia in cellule epiteliali (soprattutto in epitelii tubulari renali in prossimità di aree flogistiche attive), sia in macrofagi negli aggregati linfoidi. Quest'ultimo dato merita ulteriori approfondimenti in quanto sembra suggerire un possibile ruolo attivo dell'espressione macrofagica di HSP60 nel reclutamento immunitario e nella presentazione antigenica¹.

BIBLIOGRAFIA

1. van Eden W, van der Zee R, Prakken B. Heat-shock proteins induce T-cell regulation of chronic inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2005 Apr;5(4):318-30.
2. Granja C, Moliterno RA, Ferreira MS, Fonseca JA, Kalil J, Coelho V. T-cell autoreactivity to Hsp in human transplantation may involve both proinflammatory and regulatory functions. *Hum Immunol.* 2004 Feb;65(2):124-34.
3. Wendling U, Paul L, van der Zee R, Prakken B, Singh M, van Eden W. A conserved mycobacterial heat shock protein (hsp) 70 sequence prevents adjuvant arthritis upon nasal administration and induces IL-10-producing T cells that cross-react with the mammalian self-hsp70 homologue. *J Immunol.* 2000 Mar 1;164(5):2711-7. Yokota SI, Hirata D, Minota S, Higashiyama T,
4. Kurimoto M, Yanagi H, Yura T, Kubota H. Autoantibodies against chaperonin CCT in

human sera with rheumatic autoimmune diseases: comparison with antibodies against other Hsp60 family proteins. *Cell Stress Chaperones*. 2000 Oct;5(4):337-46.

5. Immunohistochemical detection of HSP73 and HSP72 in kidney of pigs with chronic, PRRSV related, interstitial nephritis: preliminary results. Rondena M., Gelmetti D., Gibelli L., Giudice C., Caniatti M., Finazzi M. Proceedings of the 23rd Meeting of the

European Society of Veterinary Pathology (ESVP), Napoli, 7-10 September, 2005: 186, ISBN: 88-7893-004-0

6. Imai Y, Sakurai M, Horinouchi T, Lee YS, Yamada A. Epithelial cells and adipose cells both have their own temporal profile in 72-kd heat-shock protein expression determining their tolerance for ischaemia. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2006;59(3):230-8.

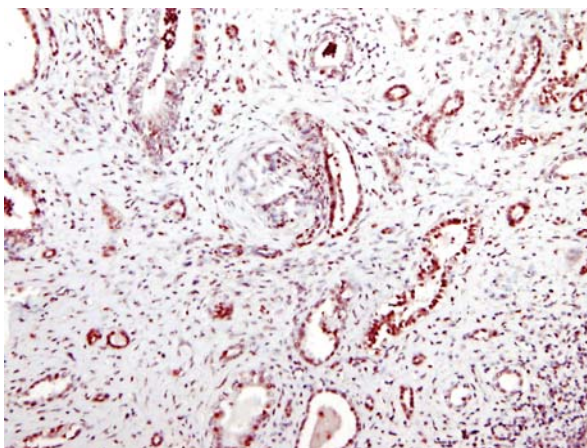


Figura 1. Rene, nefrosclerosi. IHC, anticorpo anti HSP 72. Intensa positività nucleare e citoplasmatica in tubuli renali e glomeruli. 250 X. Cromogeno AEC

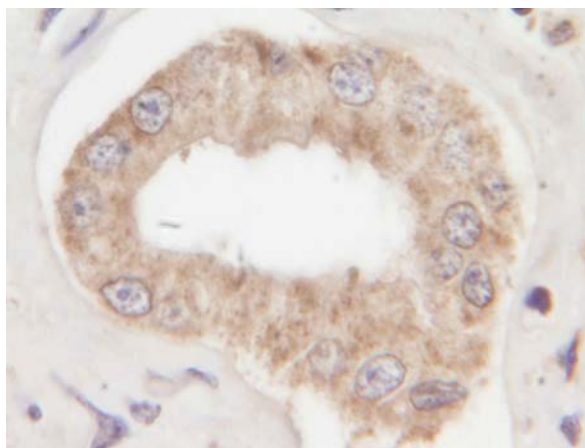


Figura 2. Rene, IHC, anticorpo anti HSP 60. Intensa positività citoplasmatici in tubulo renale. 900 X. Cromogeno DAB.

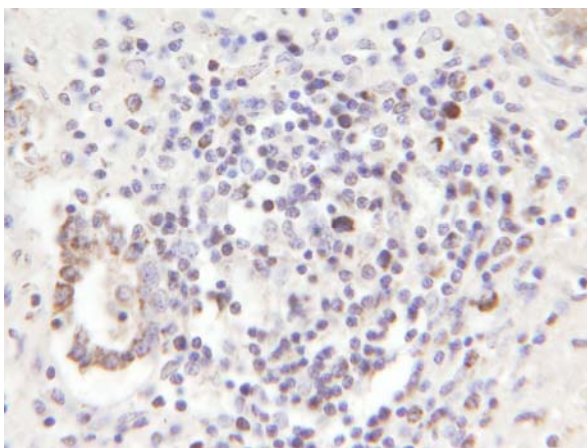


Figura 3. Rene, nefrite interstiziale, IHC, anticorpo anti HSP 60. Positivtà citoplasmatica tubulare ed in cellule infiammatorie macrofagiche. 250 X. Cromogeno DAB.

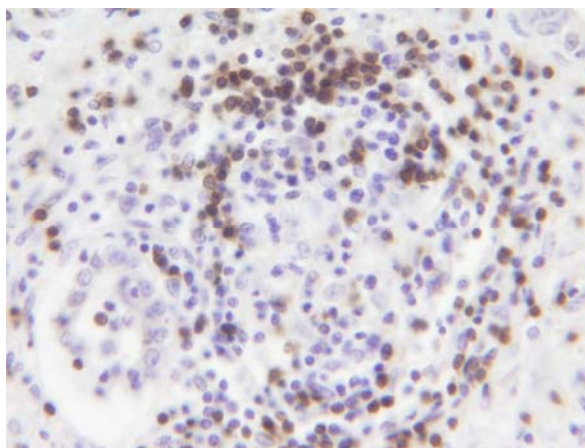


Figura 4. Rene, nefrite interstiziale, IHC, anticorpo anti CD 3. Linfociti T relativi al focolaio flogistico rappresentato nella figura precedente. 250 X. Cromogeno DAB.

HEAT SHOCK PROTEIN (HSPS) EXPRESSION IN SWINE WITH PCV2/PRRSV

Among complex mechanisms regulating innate immunity, HSPs seem to play a crucial role both in early immunitary response (T lymphocytes recruitment) and in more advanced phases, participating in cellular homeostasis and immunomodulation. It is also important to outline that HSPs are highly phylogenetically conserved proteins, being expressed in prokaryotes and eukaryotes. HSP72/73 immunohistochemical expression in kidneys of swine affected by PCV2/PRRSV and *Leptospira* and *Streptococcus* negative have been previously reported by the authors. The present report concerns the immunohistochemical expression of HSP72/73 and HSP60 in kidney, liver and lymphoid organs of the same animals and their correlation with the stage of inflammatory response.

HSP72/73 stained specifically cytoplasm and nuclei of epithelial cells and its expression was positively correlated with persistence of inflammatory process. HSP60 staining was always cytoplasmic in epithelial cells and in antigen presenting cells of spleen and lymph-nodes follicles. Intense staining of macrophages was occasionally seen in necrotic foci of PCV2 infected swine. Our data are consistent with other authors reports concerning HSP60 role in immunitary recruitment and in antigen presentation in association with MHCII. Further immunohistochemical and molecular studies will be necessary to define HSPs role in natural immunity mechanisms.

Keywords: swine, PCV2, PRRSV, HSP, immune system

INDAGINI PATOGENETICHE SUI PLESSI DEL SISTEMA NERVOSO ENTERICO DI OVINI DI RAZZA SARDA INFETTATI *PER OS* CON L'AGENTE DELLA SCRAPIE E CON DIVERSA SUSCETTIBILITA' GENETICA NEI CONFRONTI DELLA MALATTIA *

Marruchella Giuseppe¹, Malatesta Daniela¹, Petrucci Luigi¹, Lalatta Costerbosa Giovanna², Clavanzani Paolo², Chiochetti Roberto², Mazzoni Maurizio², Albanese Valeria², Agrimi Umberto³, D'Agostino Claudia³, Vaccari Gabriele³, Nonno Romolo³, De Grossi Luigi⁴, Rosone Francesca⁴, Giordani Francesco⁴, Ligios Ciriaco⁵, Sarli Giuseppe⁶, Di Guardo Giovanni¹

¹Università degli Studi di Teramo, Facoltà di Medicina Veterinaria, Dipartimento di Scienze Biomediche Comparete, Teramo; ²Università degli Studi di Bologna, Facoltà di Medicina Veterinaria, Dipartimento di Morfofisiologia Veterinaria e Produzioni Animali, Ozzano Emilia (Bologna); ³Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento di Sanità Alimentare e Animale, Roma; ⁴Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, Viterbo; ⁵Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Sassari; ⁶Università degli Studi di Bologna, Facoltà di Medicina Veterinaria, Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Ozzano Emilia (Bologna).

Sebbene il sistema nervoso enterico (ENS) svolga un ruolo cruciale nella scrapie ovina, non vi sono dati sulle popolazioni cellulari coinvolte nell'infezione, né sugli eventuali danni da esse subiti.

Il presente studio è stato condotto sui plessi mienterici e sottomucosi dell'ileo di 32 pecore di razza Sarda, recanti diversi genotipi (ARQ/ARQ, ARQ/AHQ, ARQ/ARR, ARR/ARR) con riferimento al gene codificante per la PrP^{Sc}. I suddetti animali, infettati *per os* all'età di 8 mesi con un ceppo di scrapie caratterizzato nel topo, sono stati sacrificati mediante eutanasia a determinati intervalli di tempo dall'infezione (p.i.). E' stata quindi valutata, tramite immunoistochimica ed immunofluorescenza indiretta su sezioni tessutali e su preparati "wholemout", l'immunoreattività (IR) nei confronti della PrP^{Sc}, del "marker" pan-neuronale Hu C/D, dell'ossido-nitrico sintetasi (nNOS), della calbindina (CALB), della proteina fibrillare acida gliale (GFAP) e della sinaptofisina.

In 8 pecore con genotipo ARQ/ARQ, clinicamente sane e sacrificate a 12-24 mesi p.i., nonché in 4 ovini clinicamente affetti (1 con genotipo ARQ/ARQ, 3 con genotipo ARQ/AHQ), questi ultimi sacrificati rispettivamente a 24, 35, 36,3 e 39,5 mesi p.i., le indagini immunoistochimiche hanno rivelato la presenza di PrP^{Sc} sia nell'encefalo (*obex*), sia nell'ENS, specialmente nei plessi mienterici. In tali distretti il deposito della PrP^{Sc} era compatibile con un interessamento delle cellule enterogliali (EGCs), mentre in 6 animali con genotipo ARQ/ARQ era evidente un drastico calo numerico ($P < 0,05$) dei neuroni CALB-IR rispetto ai soggetti di controllo ed a quelli con differente genotipo infettati *per os*. Inoltre, i neuroni CALB-IR mostravano una pressoché esclusiva IR nucleare.

I nostri dati supportano un coinvolgimento delle EGCs e dei neuroni CALB-IR dei plessi nervosi ileali nella scrapie ovina.

Parole chiave: Scrapie sperimentale, sistema nervoso enterico, ovino

PATHOGENETIC INVESTIGATIONS ON THE ENTERIC NERVOUS SYSTEM PLEXUSES OF SARDA BREED SHEEP WITH DIFFERENT PrP GENOTYPES FOLLOWING ORAL EXPERIMENTAL SCRAPIE INFECTION

The enteric nervous system (ENS) plays a key role in sheep scrapie, but no information exists on the cytotypes which are involved during infection, nor on the damage of such cells.

We investigated the ileal myenteric (MPs) and submucosal plexuses (SMPs) of 32 Sarda breed sheep carrying different PrP genotypes (ARQ/ARQ, ARQ/AHQ, ARQ/ARR, ARR/ARR), which had been orally dosed with scrapie at 8 months of age and euthanized at definite time intervals post-infection (p.i.). PrP^{Sc} immunoreactivity (IR), along with neuronal marker Hu C/D, nitric oxide synthase (nNOS), calbindin (CALB), glial fibrillary acidic protein (GFAP) and synaptophysin IR, were evaluated by immunohistochemistry (IHC) and indirect immunofluorescence on paraffin sections and *wholemout* preparations.

Eight clinically-healthy ARQ/ARQ sheep euthanized at 12-24 months p.i., along with 1 ARQ/ARQ (euthanized at 24 months p.i.) and 3 ARQ/AHQ (euthanized at 35, 36.3 and 39.5 months p.i., respectively) clinically-affected sheep, showed IHC evidence of PrP^{Sc} in both their brain (*obex*) and ENS, especially in MPs. PrP^{Sc} deposition

was compatible with an involvement of enteroglial cells (EGCs) and a dramatic reduction (P value < 0.05) of CALB-IR neurons was observed in the MPs of 6 ARQ/ARQ animals, as compared to normal healthy controls and to infected subjects of different PrP genotypes, which also showed an almost exclusive nuclear IR of these cells.

Therefore, EGCs and CALB-IR neurons of ileal ENS plexuses are likely involved in sheep scrapie.

Keywords: Experimental scrapie, enteric nervous system, sheep

ACCUMULO DI PrP^{Sc} NELLA GHIANDOLA MAMMARIA DI PECORE COINFETTATE SPERIMENTALMENTE CON SCRAPIE E VIRUS MAEDI-VISNA

¹Cancedda Maria Giovanna, ⁴Sigurdson J.Christina, ²Saba Mariangela, ³Carcassola Gabriella, ²Demontis Franca, ²Uras Patrizia, ²Zucca Rosalba, ²Santucci Cinzia, ²Demurtas Giulia, ²Maestrale Caterina, ²Madau Laura, ²Ligios Ciriaco, ⁴Aguzzi Adriano

¹Istituto Zootecnico Caseario della Sardegna - Olmedo; ²Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna - Sassari, ³Dip. di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Sez. di Microbiologia e Immunologia, Università degli Studi - Milano; ⁴UniversitätsSpital Zürich, Institute of Neuropathology Department of Pathology - Zurigo

La scrapie è una malattia neurodegenerativa ad esito infausto dell'ovino caratterizzata dall'accumulo di una proteina patologica (PrP^{Sc}) nel sistema nervoso centrale (SNC) e nel sistema linfatico-reticolare (SLR). Di recente è stato dimostrato l'accumulo ectopico di PrP^{Sc} in aggregati di cellule infiammatorie formatesi nel fegato, nel rene e nel pancreas di topi transgenici che sviluppavano infiammazioni in organi specifici. Allo scopo di verificare se lo stesso fenomeno possa avvenire in ovini affetti contemporaneamente da scrapie e mastite cronica, sono stati utilizzati 3 gruppi di 20 agnelli ciascuno. I gruppi erano formati sulla base del genotipo degli agnelli, rispettivamente ARQ/ARQ, ARR/ARR ed ARQ/ARR. In particolare per ciascuno dei 3 gruppi, 10 agnelli sono stati coinfectati per *os* con un omogenato ottenuto da un pool di cervelli di pecore con scrapie clinica e con una coltura di virus Maedi-Visna (VMV) per via intratracheale ed intravenosa. I rimanenti 10 sono stati infettati solo con l'omogenato di cervelli.

Nel gruppo dei soggetti ARQ/ARQ 9 delle 10 pecore coinfectate con omogenato di cervello e con VMV hanno manifestato sintomi neurologici a partire dal 19° mese post-infezione. In 8 di queste 9 pecore, l'esame immunoistochimico (IIC) e il western blotting (WB) hanno evidenziato la presenza di PrP^{Sc} sia nel SNC che nel SLR. Tra queste, in 2 affette anche da mastite linfoproliferativa, a seguito dell'infezione con VMV, PrP^{Sc} è stata riscontrata nella mammella mediante l'esame IIC.

Parole chiave: scrapie, sheep, virus maedi-visna, infiammazione

PrP^{Sc} DEPOSITION IN MAMMARY GLAND OF SHEEP EXPERIMENTALLY COINFECTED WITH SCRAPIE AND MAEDI-VISNA VIRUS

Scrapie, a fatal neurodegenerative disorder of sheep, is characterized by deposition of an abnormal isoform of prion protein (PrP^{Sc}) in the central nervous system (CNS) and within the lymphoreticular system (LRS). Recent studies in mice transgenically engineered to develop organ specific inflammation demonstrated the co-occurrence of PrP^{Sc} in the inflamed organs (kidney, pancreas and liver). To test the possibility that ectopic PrP^{Sc} replication occurs in sheep affected with scrapie and chronic mastitis, Sarda breed lambs of three different PrP genotypes (136/154/171: ARQ/ARQ, ARQ/ARR and ARR/ARR, n=20 each) were used. For each genotype, 10 lambs were inoculated with Maedi-Visna virus (MVV) intratracheally and intravenously, and with scrapie brain homogenate by the oral route. The remaining 10 lambs were inoculated with scrapie brain homogenate only. Nine of 10 ARQ/ARQ sheep inoculated with scrapie and MVV showed neurological signs starting from 19 months post inoculation. Immunohistochemical (IHC) and western blotting (WB) yielded evidence of PrP^{Sc} deposition in CNS and LRS of 8 sheep. Furthermore, preliminary results demonstrated that 2 of the 8 scrapie affected sheep showed IHC evidence of PrP^{Sc} deposition in the mammary gland.

Keywords: scrapie, sheep, maedi-visna virus, inflammation

STUDIO DI UN MODELLO ANIMALE PER LA SINDROME MEN I UMANA

Rossi Giacomo*, Mari Subeide*, Pietro Guli^o, Renzoni Giacomo*, Magi Gian Enrico*.

*Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università di Camerino. ^o Libero Professionista

La sindrome multineoplastica endocrina dell'uomo (MEN) è caratterizzata dalla contemporanea presenza nello stesso paziente di tumori che coinvolgono due o più ghiandole endocrine. Esistono due forme principali della sindrome MEN, il tipo I (MEN I, sindrome di Wermer) ed il tipo II (MEN II, sindrome di Sipple); ognuna di queste forme è caratterizzata dallo sviluppo di tumori in specifiche ghiandole endocrine. Il furetto (*Mustela putorius furo*) rappresenta una specie animale relativamente poco studiata dal punto di vista patologico, e si candida tra le specie che più frequentemente, forse anche più dell'uomo, risultano colpite da neoplasie delle ghiandole endocrine sviluppando una sindrome MEN-like. Studi recenti hanno dimostrato che la patogenesi della sindrome MEN umana è legata a mutazioni del gene MEN1 che determinano una alterazione morfofunzionale del suo prodotto, la proteina menina. Questa proteina, potendo essere traslocata in condizioni normali in sede nucleare, rappresenta un importante fattore di regolazione del ciclo cellulare, avendo una funzione p53-like. Mutazioni della menina si traducono in una sua segregazione citoplasmatica e in un blocco della sua attività regolatrice, in senso inibente, la replicazione cellulare. Il nostro studio, effettuato su 65 neoplasie endocrine di altrettanti furetti, evidenzia come anche nei tessuti neoplastici di furetto vi sia una significativa alterazione dell'espressione della menina, rispetto a ghiandole endocrine di controllo. Queste valutazioni indicano il furetto un interessante modello di studio per la cancerogenesi multiendocrina, dal momento che la specie sviluppa spontaneamente quadri rapportabili alla sindrome MEN I umana e condivide con questa il meccanismo patogenetico, determinato da una alterata espressione della proteina menina.

Parole chiave: furetto, sindrome MEN I, gene MEN1, menina, modello animale

AN ANIMAL MODEL OF HUMAN MEN I SYNDROME

The human "multiple endocrine neoplasia" (MEN) syndrome is characterized by the simultaneous occurrence of tumors involving two or more endocrine glands within a single patient. There are two major forms of MEN, type I (Wermer's syndrome) and type II (Sipple's syndrome); both are characterized by the development of tumors within specific endocrine glands. Ferret (*Mustela putorius furo*), particularly the Marshall breed, represents the most affected animal species by endocrine neoplasms, reportable to a MEN-like syndrome. In human, different studies demonstrate the central role of some mutations in the MEN1 gene and relative alterations of his product, the menin protein, in the pathogenesis of the MEN syndrome. In our study, based on the analysis of 65 neoplasms belonging to different endocrine glands of ferret, we have observed statistically significant differences in the levels of expression of menin protein in comparison with control, unaffected glands. For this reason we hypothesized that a genetic mutation may be evokes also in the pathogenesis of the ferret's MEN syndrome, and we evidenced that the ferret can represent an interesting animal model to study the human form. The importance of this model is related to the fact that ferret spontaneously develops a similar outline of the human MEN I syndrome by a common pathogenetic mechanisms, related to the alteration of menin protein's expression.

Keywords: ferret, MEN I syndrome, human, menin, animal model

ANALISI DELL'ESPRESSIONE DEL RECETTORE PER GLI ESTROGENI A E B, DEL RECETTORE PER IL PROGESTERONE E DI ERB-B2/NEU IN CARCINOMI MAMMARI FELINI E CONTROLLI APPAIATI MEDIANTE RT-PCR REAL-TIME

Bargelloni Luca, Cardazzo Barbara, Antonello Jenny, Zappulli Valentina, Castagnaro Massimo

Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria, Università di Padova, viale dell'Università 16, Agripolis, Legnaro, Italy

La maggior parte dei carcinomi mammari umani esprimono il recettore per gli estrogeni (ER) e quello per il progesterone (PR). Livelli elevati di recettori per questi steroidi sessuali rappresentano un fattore prognostico positivo, mentre i carcinomi negativi per ER spesso presentano un'aumentata espressione dell'oncogene Erb-B2/Neu, che è associata con una prognosi sfavorevole. I carcinomi mammari felini risultano frequentemente essere negativi per ER e/o PR. Lo scopo del presente lavoro è stato quello di valutare, a livello molecolare, l'espressione di ER- α , ER- β , P in carcinomi mammari felini e in controlli sani. Sono stati raccolti campioni di tessuto normale e neoplastico in 26 casi di carcinoma mammario felino. Dopo aver estratto e retrotrascritto l'RNA totale, i valori relativi di espressione dei geni in esame sono stati misurati mediante PCR quantitativa real-time. Il gene codificante la b-glucuronidasi è stato utilizzato per la normalizzazione. I valori ottenuti e log-trasformati per ciascuna coppia di campioni (sano-neoplastico) sono stati analizzati mediante test dei ranghi di Wilcoxon per campioni appaiati. L'espressione di ER- α e PR è risultata essere significativamente inferiore ($P < 0,0001$) nel tessuto neoplastico rispetto al controllo sano appaiato. ER- β e Erb-B2/Neu non presentavano differenze significative tra i due gruppi. L'analisi molecolare conferma che la maggior parte dei carcinomi mammari felini sono negativi per ER e PR, mentre rimane aperto il problema del ruolo di Erb-B2 nei tumori mammari della gatta.

Parole chiave: carcinoma mammariofelino, recettore per gli estrogeni, recettore per il progesterone, Erb-B2, RT-PCR real-time

REAL-TIME RT-PCR EXPRESSION ANALYSIS OF ESTROGEN-RECEPTOR A, ESTROGEN-RECEPTOR B, PROGESTERONE RECEPTOR, AND ERB-B2/NEU IN FELINE MAMMARY CARCINOMAS AND MATCHED CONTROLS

The majority of human breast carcinomas (HBCs) are positive for estrogen- and progesterone-receptors (ER, PR) expression. High levels of sex-steroid receptors represent a good prognostic factor, whereas ER-negative HBCs often show increased expression of the oncogene Erb-B2/Neu, which is associated with a poor prognosis. Feline mammary carcinomas (FMCs) appear to be frequently ER-negative and/or PR-negative. The aim of the present study was to evaluate, at the molecular level, the expression of ER- α , ER- β , PR, and Erb-B2/Neu in FMCs by comparison with normal controls. Adjacent samples of normal breast tissue and matched primary breast tumours were obtained from 26 female cats. After total RNA extraction and reverse transcription, relative expression of each target gene was measured by means of quantitative real-time PCR. Beta-glucuronidase was used as reference gene. Log-transformed values of expression for each sample pair (FMC and matched control) were analysed in a Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test. Expression of ER- α and PR was significantly lower ($p < 0.0001$) in FMCs compared to matched controls. ER- β and Erb-B2/Neu showed no significant difference between the two groups. Molecular evidence confirms that most FMCs are ER- and PR-negative, whereas it raises a question on the recently proposed role for Erb-B2 in feline mammary tumours.

Keywords: feline mammary carcinomas, estrogen receptor, progesterone receptor, Erb-B2, RT-PCR real-time

ANGIOMATOSI CUTANEA NELLA SPECIE CANINA: DATI CLINICI E CARATTERIZZAZIONE ISTOPATOLOGICA

Avallone Giancarlo*, Crippa Luca^o, Iussich Selina[§], Roccabianca Paola*.

**DiPAV-Sezione di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviare- Facoltà di Medicina Veterinaria- Milan. [§] DiPatAn sezione di Anatomia Patologica- Facoltà di Medicina Veterinaria - Università degli Studi di Torin. ^oIstovet- laboratorio di analisi istopatologica veterinaria- Besana Brianza (Milano)*

In medicina umana il termine angiomatosi comprende una serie di lesioni a carico dei vasi in cui sono incluse malformazioni (amartomi vascolari), proliferazioni reattive (angiomatosi reattive) e neoplastiche (angiomatosi propriamente dette). In medicina veterinaria sono stati descritti tre tipi di lesioni vascolari paragonabili alle angiomatosi dell'uomo: l'angiomatosi progressiva, l'amartoma vascolare scrotale, e l'angiomatosi secondaria a linfedema. In questo studio sono stati esaminati campioni bioptici di 12 lesioni vascolari cutanee nella specie canina. I soggetti erano cani di pura razza, di età media di 8.1 anni (range 4-16), 9 femmine e 3 maschi. In 7 cani le lesioni erano localizzate a livello degli arti, in 3 a livello toraco-addominale ed in 2 erano in prossimità dei capezzoli. Le lesioni erano singole ad eccezione di due casi a carattere multicentrico. All'esame istologico sono state identificate 9 casi riferibili ad angiomatosi arterovenosa e 3 casi ad angiomatosi capillare. Una prognosi negativa (recidiva o decesso) è stata associata a localizzazione toracica (3/3) di cui 2 con istotipo capillare. Sei angiomatosi arterovenose non hanno recidivato anche se in un caso è stata osservata invasione ossea. Le caratteristiche istologiche dei casi osservati erano sovrapponibili a quelle descritte in medicina umana dal punto di vista istologico assumendo, nel 25% dei casi, anche un comportamento biologico simile. Tuttavia, l'angiomatosi canina sembra essere una patologia di animali adulti/anziani con una prevalenza in soggetti di sesso femminile mentre nell'uomo, l'angiomatosi è una patologia pediatrica senza prevalenza di sesso. Per trarre conclusioni più accurate sui dati clinico-patologici e prognostici dell'angiomatosi è necessaria una casistica più ampia.

Parole chiave: cane, angiomatosi progressiva, amartoma vascolare

CANINE CUTANEOUS ANGIOMATOSIS: CLINICAL AND HISTOPATHOLOGICAL CHARACTERIZATION

In human medicine the term angiomatosis encompasses a wide range of vascular lesion including malformations (vascular hamartomas), reactive vascular proliferations (reactive angiomatosis) and neoplasm (soft tissues angiomatosis). In veterinary medicine 3 types of angiomatosis have been described: progressive angiomatosis, scrotal vascular hamartoma and angiomatosis secondary to lymphedema. In this study, 12 canine cutaneous vascular lesion were studied. Dogs included in this work were all pure breed, with a 8.1 mean age (range 4-16), 9 females and 3 males. In 7 dogs lesions were in an acral location, 3 were in the thoraco-abdominal regions and 2 were near the nipples. Most lesions were localized with the exception of 2 multicentric thoracic presentations. Nine artero-venous angiomatosis and 3 cases of capillary angiomatosis were identified. Negative prognosis (local recurrence or death) was associated with thoraco-abdominal location (3/3) two of which were of the capillary histotype. No recurrence was observed in 6 arterovenous angiomatosis but one was characterized by bone invasion. Microscopic features and biological behaviour (25% of dogs) paralleled what is described in human medicine. On the contrary, canine angiomatosis develops in adult/senile dogs with a female gender prevalence while in humans the disease is characteristically paediatric with no gender prevalence. To gather further and more precise insights on canine angiomatosis a wider caseload is felt necessary.

Key words: dog, progressive angiomatosis, vascular hamartoma

FENOTIPIZZAZIONE ISTOPATOLOGICA E DETERMINAZIONE DELLA CAUSA DI MORTE PREMATURA IN TOPI TRANSGENICI CON OVERESPRESSIONE UBIQUITARIA DI FRG1

Crippa Luca¹, Moggio Maurizio², Zecca Chiara², Tupler Rossella³

¹ ISTOVET Analisi istopatologiche e servizi per la Ricerca Scientifica, 20050 Gerno di Lesmo (MI)

² U.O. Neurologia, Università degli Studi di Milano, I.R.C.C.S. Fondazione Ospedale Maggiore, 20122 Milano. ³ Biologia Generale e Genetica Medica, Università degli Studi di Pavia, 27100, Pavia

La distrofia facioscapolomerale (FSHD) nell'uomo è una patologia genetica autosomica dominante dovuta ad una delezione nella porzione D4Z4 del cromosoma 4 (4q35). Recentemente è stato dimostrato in topi transgenici che la selettiva overespressione nella muscolatura scheletrica del gene FRG1 (un gene localizzato nella porzione 4q35 del cromosoma 4) produce una sindrome miodistrofica molto simile, per distribuzione e gravità, alla FSHD nell'uomo. Per approfondire le conseguenze dell'overespressione di FRG1 è stato prodotto un secondo modello murino transgenico caratterizzato da ubiquitaria overespressione di FRG1. Inaspettatamente in questo nuovo modello transgenico è stata osservata, entro le prime 12 settimane di vita, un'elevata incidenza di mortalità prematura caratterizzata da rapido ed improvviso peggioramento delle normali condizioni di salute con esito in 6-12h. Per determinare la causa di morte prematura e fenotipizzare istopatologicamente il nuovo modello un topo sacrificato in extremis e 8 topi spontaneamente deceduti sono stati sottoposti ad esame necroscopico ed istopatologico. La fenotipizzazione istopatologica del modello è stata eseguita valutando i principali organi ed apparati e studiando la differente distribuzione delle lesioni miodistrofiche in diversi distretti muscolari. Tutti gli animali esaminati mostravano severa miocardiopatia necrotico/degenerativa principalmente del cuore sinistro. Lesioni miodistrofiche sono state riscontrate in tutti i distretti di muscolatura scheletrica considerati. Nessuna lesione di rilievo è stata osservata a carico della muscolatura liscia. Nessuna lesione è stata osservata in altri organi ed apparati. La causa di morte prematura di topi transgenici che overesprimono ubiquitariamente FRG1 è l'insufficienza cardiaca congestizia cronica conseguente a severa miocardiopatia distrofico/degenerativa. L'overespressione ubiquitaria di FRG1 produce tipiche lesioni miodistrofiche in tutti i principali distretti di muscolatura scheletrica considerati. La muscolatura liscia non è coinvolta.

Parole chiave: distrofia muscolare, modelli transgenici, FRG1, overespressione ubiquitaria, fenotipizzazione

HISTOPATHOLOGICAL PHENOTYPING AD DETERMINATION OF THE CAUSE OF PREMATURE DEATH IN TRANSGENIC MICE UBIQUITARY OVEREXPRESSING FRG1

Human facioscapulohumeral dystrophy (FSHD) is an autosomal dominant neuromuscular disorder due to a chromosomal deletion located on D4Z4 of chromosome 4 (4q35). In a recent study was shown that transgenic overexpression of 4q35-gene FRG1 in skeletal muscles causes muscular dystrophy in mice with features characteristic of the human disease. To better understand the role of FRG1 in muscular dystrophy a new transgenic mouse model with FRG1 ubiquitary overexpression was generated. Unfortunately, this new transgenic model was characterised by premature mortality within 12 weeks of life. To understand the cause of premature mortality and to histopathologically phenotyping the new animal model 1 in extremis sacrificed mouse and 8 found dead mice were necropsyed and histopathologically examined. Histopathological phenotyping was carried out evaluating the main organs and muscular districts. All the examined mice showed severe necrotic/degenerative myocardiopathy mainly of left heart. Dystrophic changes were observed in all the examined muscular districts. The cause of premature mortality in transgenic mice ubiquitary overexpressing FRG1 is congestive heart failure due to severe necrotic/degenerative chronic myocardiopathy. FRG1-ubiquitary-overexpression induces myodistrophic changes in all the main examined muscular districts.

Keywords: muscular dystrophy, transgenic models, FRG1, ubiquitary overexpression, phenotyping

EFFETTI MEDIATI DALLA PROLATTINA NEGLI STUDI DI TOSSICOLOGIA GENERALE NEL RATTO: INTERPRETAZIONE ED ESTRAPOLAZIONE ALLA CLINICA

Defazio Rossella, Lanzoni Anna, Cristofori Patrizia, Giannotti Elena

Safety Assessment Dept. Histopathology Medicine Research Centre – GlaxoSmithKline, via A. Fleming, 4 – Verona, Italia

La prolattina e' un ormone peptidico sintetizzato e secreto per la maggior parte dalle cellule lattotrope del lobo anteriore dell'ipofisi, ed in minor misura dal sistema nervoso centrale, dal sistema immunitario, dall' utero e dagli invogli fetali. La sua attivita' regola svariati processi fisiologici nell'ambito della riproduzione, dal comportamento sessuale alla lattazione, ed in quello dell' omeostasi, dal momento che riveste un ruolo di primaria importanza nella risposta immunitaria, nell'osmoregolazione e nell'angiogenesi. La secrezione prolattinica dell'adenipofisi, puo' essere modificata da cambiamenti nell'assetto ormonale e/o da molteplici stimoli ambientali, come la luce, i suoni, lo stress e come pure da farmaci. Infatti e' noto che alcune classi di composti sono in grado di modulare la secrezione di prolattina determinando, a carico di vari apparati, effetti morfologici e funzionali a volte dissimili tra le specie precliniche e l'uomo. In particolare, e' noto che la prolattina svolge una funzione mammotrofica e lattogenica nel roditore e nell'uomo, mentre le funzioni luteotrofica e luteolitica, presenti nel ratto non si verificano nell'uomo. Questa presentazione vuole offrire una panoramica sugli effetti istopatologici determinati dalle variazioni dei livelli di prolattina circolanti nel ratto maschio e femmina e proporre spunti per l'interpretazione della loro significativita' nel contesto degli studi preclinici e nelle conseguenze cliniche.

Parole chiave: prolattina; roditore; istopatologia, risk assessment

PROLACTIN-MEDIATED EFFECT IN RAT GENERAL TOXICITY STUDY: INTERPRETATION AND EXTRAPOLATION TO CLINIC

Prolactin is a protein hormone synthesized and secreted mostly by the lactotroph cells of the anterior pituitary, but also by the central nervous system, the immune system, the uterus and its associated tissues of conception. Prolactin activity rules different physiological processes in the reproduction context, from the sexual behaviour to lactation, and in the homeostasis, since it plays an important role in the immune response, in the osmoregulation and in the angiogenesis. Prolactin secretion from the anterior pituitary can be modified by changes in the hormonal profile and/or by environmental stimuli, such as light, sound, stress and also by drugs. In fact it is known that some classes of compound are able to modulate prolactin secretion causing, in many systems, morphological and functional effect, that can be different between preclinical species and human. In particular, it is known that prolactin has a mammotrophic and lactogenic effect in rodent and human, otherwise luteotrophic and luteolytic function, seen in rat, are not present in human. This presentation would offer an overview on the histopathological effects related to changes in prolactin circulating level in both male and female rat and give some indications to interpret their significance in the context of preclinical studies and risk assessment.

Key words: prolactin, rodent, histopathology, risk assessment

ESEMPIO DI UTILIZZO DELLA MICROSCOPIA ELETTRONICA A SCANSIONE AMBIENTALE (ESEM) ASSOCIATA A MICROANALISI A RAGGI X IN UNO STUDIO DI TOSSICOLOGIA

Faustinelli Ivo¹, Rossetti Marco², Cristofori Patrizia¹, Lanzoni Anna¹

¹*Safety Assessment Dept. Histopathology Unit Research Centre GlaxoSmithKline Verona Italy,*

²*Pharmaceutical Development Research Centre GlaxoSmithKline Verona Italy.*

In uno studio di tossicologia, volto a evidenziare la tossicità dell'oro colloidale nel ratto, è stata utilizzata la microscopia elettronica a scansione ambientale (ESEM) associata alla microanalisi a raggi X a supporto dell'esame istopatologico. In particolare, la valutazione istopatologica è stata eseguita su campioni di fegato, milza, cuore, reni, polmoni, testicoli e cervello di ratti maschi trattati con il veicolo e di ratti maschi trattati con una sospensione di oro colloidale somministrata per via intraperitoneale, sacrificati dopo 24h o 48 h dopo il trattamento. Successivamente, è stato eseguito l'esame ultrastrutturale, mediante microscopia elettronica a scansione e microanalisi a raggi X per valutare la presenza di particelle di oro sulla superficie di ciascuno di questi tessuti e quindi associare la tossicità osservata all'esame istopatologico alla presenza del composto test a livello dei diversi tessuti considerati.

Parole chiave: microscopia elettronica a scansione, microanalisi a raggi X, oro.

AN EXAMPLE OF APPLICATION OF ENVIRONMENTAL SCANNING ELECTRON MICROSCOPY (ESEM) ASSOCIATED WITH X-RAY MICROANALYSIS IN A TOXICOLOGICAL STUDY

In a toxicological study aimed to evaluate the toxicity of colloidal gold toxicity in different rat tissues, the Environmental Scanning Electron Microscopy (ESEM) associated with X ray microanalysis has been used to support histological examination. In particular, microscopic examination was performed on liver, spleen, heart, kidney, lungs, testes and brain samples from vehicle-treated male rats or male rats treated with colloidal gold by intraperitoneal administration and killed 24h or 48h after dosing. Subsequently, the ultrastructural examination by environmental scanning electron microscopy and X ray microanalysis has been performed to evaluate the presence of gold particles on the surface of each of these tissue and to link histopathological results to the presence of the test compound in the examined tissues.

Keywords: scanning electron microscopy, X-rays microanalysis, gold

PATOLOGIA RESPIRATORIA DA *MYCOPLASMA BOVIS* IN VITELLI E BOVINI ADULTI DA MACELLO DEL NORD ITALIA

Radaelli Enrico¹, Burigana Nicoletta², Ripamonti Giuseppe³, Loria Guido Ruggero⁴, Luini Mario⁵, Nicholas Robin A. J.⁶, Scanziani Eugenio¹.

¹ Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Sezione di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Milano; ² Ministero della Salute, Ufficio Veterinario Adempimenti Comunitari (UVAC), Compartimento Lombardia, Milano; ³ Medico Veterinario, Novedrate (Co); ⁴ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, Palermo; ⁵ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Lodi; ⁶ Mycoplasma Group, Veterinary Laboratories Agency (Weybridge), KT15 3NB, UK.

Mycoplasma bovis rappresenta un agente batterico frequentemente coinvolto nei fenomeni di broncopolmonite enzootica bovina. Mancano tuttavia dati attuali circa la rilevanza che tale microorganismo assume negli episodi di polmonite bovina in Italia. Scopo di questo lavoro è valutare il ruolo di *M. bovis* quale patogeno respiratorio nell'allevamento bovino da carne del nord Italia.

Sono stati considerati 14 bovini da carne (70 adulti di 20 mesi e 70 vitelli di 6 mesi) regolarmente macellati e provenienti da 14 allevamenti dislocati tra Lombardia e Piemonte. I bovini sono stati raggruppati in base alla provenienza in 14 gruppi ognuno dei quali composto da 10 soggetti così selezionati: 7 bovini con lesioni pneumoniche macroscopiche e 3 privi di lesioni. Su campioni polmonari prelevati da ogni bovino, è stato eseguito esame batteriologico, con eventuale identificazione biomolecolare dei micoplasmi isolati, esame istologico ed immunostochimico per *M. bovis*. Campioni di sangue sono stati sottoposti a valutazione sierologica per *M. bovis*.

M. bovis è stato il batterio identificato con più frequenza da lesioni polmonari con 16 campioni positivi provenienti unicamente da vitelli. In 14 di questi casi erano presenti reperti di broncopolmonite cronica. Sui campioni batteriologicamente positivi per *M. bovis* l'esame immunostochimico è risultato positivo in soli 7 casi. Tutti i vitelli e gran parte dei bovini adulti erano inoltre sierologicamente positivi a *M. bovis*.

I risultati ottenuti sottolineano il ruolo di *M. bovis* quale patogeno respiratorio nell'allevamento del bovino da carne nel nord Italia. L'elevata positività sierologica rapportata al moderato (vitelli) o assente (bovini adulti) coinvolgimento di *M. bovis* a livello di lesione polmonare cronica indica come l'infezione si sviluppi verosimilmente in un periodo antecedente ai 6 mesi di età.

Parole chiave: bovini da carne, *Mycoplasma bovis*, polmonite.

INTRODUZIONE

La sindrome respiratoria bovina, definita anche broncopolmonite enzootica bovina, rappresenta a livello mondiale la principale causa di perdita economica nell'allevamento del bovino da carne (1). L'instaurarsi di fenomeni broncopneumonici si associa infatti ad un notevole incremento della morbilità-mortalità all'interno del gruppo con conseguente aumento dei costi di gestione sanitaria e minor resa alla macellazione.

La broncopolmonite enzootica oltre ad importanti fattori di tipo ambientale-gestionale (trasporto, reinstallazione, sovraffollamento, ecc.) vede primariamente coinvolti numerosi patogeni sia virali che batterici (Bovine

Respiratory Syncytial Virus, Bovine Parainfluenza Virus 3, Bovine Herpesvirus 1, *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma bovis*, ecc.) (2).

Recenti indagini di campo svolte in corso di patologia spontanea indicano come *M. bovis* rappresenti ad oggi l'agente patogeno primariamente implicato negli episodi di sindrome respiratoria del bovino da carne in differenti realtà produttive (3). Tale tendenza è stata confermata anche in Italia dove sia nelle regioni del Nord-Est (4) che in Sicilia (5), *M. bovis* è risultato l'agente batterico isolato con più frequenza da lesioni pneumoniche.

Scopo del seguente lavoro è valutare il ruolo di *M. bovis* quale patogeno respiratorio

nell'allevamento bovino da carne del nord Italia.

MATERIALI E METODI

In questo lavoro sono stati considerati 140 bovini da carne, regolarmente macellati, appartenenti a due principali categorie: 70 bovini adulti di circa 20 mesi e 70 vitelli a carne bianca di circa 6 mesi. Gli animali provenivano da 14 differenti allevamenti dislocati tra Lombardia e Piemonte. I bovini sono stati raggruppati in base alla provenienza in 14 gruppi ognuno dei quali composto da 10 soggetti così selezionati: 7 bovini con lesioni pneumoniche macroscopiche e 3 privi di lesioni. In sede di macellazione, per ogni bovino considerato, sono stati effettuati i seguenti prelievi:

- Campione di sangue in corso di taglio ispettivo del muscolo cardiaco.
- Porzioni di lesione polmonare o, in assenza di reperti lesivi macroscopici, porzione di parenchima polmonare proveniente dal lobo apicale destro.

Sul siero ottenuto (1800 RPM per 10 min) dai campioni di sangue raccolti è stato effettuato un ELISA-test specifico per *M. bovis*.

I campioni di parenchima polmonare prelevati sono stati sottoposti ai seguenti esami:

- Esame batteriologico e ricerca micoplasmi con eventuale identificazione biomolecolare (PCR) sia per *Mycoplasma* spp. (genere) che per *M. bovis* (specie) eseguita a partire dalle colonie isolate attraverso la batteriologia.
- Esame istologico.
- Esame immunoistochimico [metodo avidina-biotina-perossidasi (ABC)] mediante utilizzo di anticorpo primario policlonale, prodotto in coniglio, specifico per *M. bovis* (6).

RISULTATI

Le lesioni macroscopiche osservate con più frequenza in sede di macellazione erano caratterizzate da aree rossastre di consolidamento parenchimale in gran parte localizzate ai lobi apicali. I Corrispondenti reperti istopatologici erano riferibili a fenomeni di broncopolmonite catarral-

desquamativa cronica associata a peribronchiolite follicolare con presenza intralveolare di macrofagi e cellule giganti multinucleate.

La totalità dei vitelli a carne bianca (70/70) e ben il 76% dei bovini adulti (53/70) è risultato positivo all'esame sierologico per *M. bovis*.

M. bovis, isolato batteriologicamente in 16 casi su 140 (11,5%), ha rappresentato in assoluto il patogeno batterico identificato con più frequenza a livello polmonare. Dall'indagine batteriologica è inoltre emerso come i campioni positivi pervenissero unicamente dal gruppo dei vitelli a carne bianca (Grafico 1).

Tutti i campioni batteriologicamente positivi per *M. bovis* erano caratterizzati da reperti infiammatori cronici di cui: 7 casi di broncopolmonite catarral-desquamativa cronica; 7 casi di broncopolmonite catarral-desquamativa cronica associata a fenomeni necrosuppurativi; singolo caso di polmonite fibrino-necrotica cronica; singolo caso di polmonite interstiziale cronica.

L'esame immunoistochimico ha evidenziato la presenza di immunopositività riferibile a *M. bovis* in 7 casi su 140. In tutti i 7 casi l'immunomarcatura si associava a un dato batteriologico positivo per *M. bovis*. Confrontando inoltre i risultati immunoistochimici con i reperti morfopatologici dei campioni batteriologicamente positivi per *M. bovis*, ne è emerso come la positività immunoistochimica fosse correlata in modo significativo alla presenza di focolai di necrosi (Grafico 2). I focolai necrosuppurativi associati ai fenomeni di broncopolmonite catarral-desquamativa erano macroscopicamente caratterizzati da lesioni ascessuali contenenti essudato puriforme (Figura 1). Istologicamente tali lesioni presentavano accumulo di materiale necrotico granulare frammisto a cellule infiammatorie degenerate ad elevata componente macrofagica e reazione capsulare periferica con infiltrazione plasmacellulare. Le lesioni associate ai reperti di pleuropolmonite fibrino-necrotica macroscopicamente consistevano in confluenti aree lobulari con accumulo di materiale necrotico dall'aspetto caseoso circondato perifericamente da marcato rinforzo dei setti interlobulari. Istologicamente si osservavano estese raccolte di detrito necrotico grossolanamente granulare

circondato da cellule infiammatorie degenerate, reazione fibroblastica ed infiltrazione istiocito-plasmacellulare (Figura 2). L'associazione tra patogeno e fenomeni necrosuppurativi veniva ulteriormente confermata dalla distribuzione di elevate quantità di antigene riferibile a *M. bovis* in rapporto alla periferia dei focolai di necrosi parenchimale e in associazione al materiale necrotico all'interno del lume di bronchi e bronchioli (Figura 3).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'elevata positività sierologica osservata in entrambe le categorie di animali (vitelli a carne bianca e bovini adulti) rappresenta sicuramente un valido indicatore della massiva diffusione e circolazione di *M. bovis* nell'allevamento del bovino da carne del nord Italia. Tali osservazioni sono ulteriormente corroborate dal dato batteriologico che evidenzia come *M. bovis* sia il patogeno batterico identificato con più frequenza a livello polmonare.

In diversi studi volti a definire la patogenicità di *M. bovis* a livello polmonare emerge come tale patogeno a livello respiratorio dia difficilmente luogo a rapporti di tipo opportunistico con l'ospite bovino. La sua identificazione risulterebbe infatti correlata in modo significativo a reperti broncopneumonici (4). In accordo con tale tendenza, da questo studio emerge come i casi batteriologicamente positivi per *M. bovis* risultino significativamente associati a quadri lesivi sottolineando come la presenza del patogeno a livello polmonare sostenga costantemente processi flogistici.

La positività all'esame immunoistochimico, osservata unicamente nei casi batteriologicamente positivi per *M. bovis*, viene interpretata quale indicatore della numerosità del patogeno stesso a livello di lesione polmonare. In tal senso la costante colocalizzazione di abbondante antigene batterico in rapporto ai gravi processi necrosuppurativi suggerisce come la massiva presenza del patogeno sia la causa primaria di tali reperti patologici (6).

In base alle due differenti categorie di appartenenza dei bovini (soggetti di circa 6 mesi e soggetti di circa 20 mesi) è possibile

estrapolare una verosimile dinamica temporale delle diverse valutazioni effettuate. Ne risulta come i valori delle positività sierologica, batteriologica ed immunoistochimica siano inversamente proporzionali all'età degli animali (Grafico 3). Inoltre l'elevata positività sierologica osservata in entrambe le categorie di animali, rapportata al moderato (vitelli) o assente (bovini adulti) coinvolgimento di *M. bovis* a livello di lesioni polmonari croniche, è un indice di come l'infezione abbia luogo verosimilmente in un periodo antecedente ai 6 mesi di età. Le differenti valutazioni effettuate fotografano quindi l'andamento del processo infettivo indotto da *M. bovis* nella sua fase finale. Per tali ragioni si ritiene che lo studio della patologia polmonare in soggetti di età inferiore ai 6 mesi potrebbe fornire utili indicazioni riguardo la reale entità di *M. bovis* quale agente di sindrome respiratoria bovina.

BIBLIOGRAFIA

1. Haanes EJ, Guimond P, Wardley R (1997). The bovine parainfluenza virus type-3 (BPIV-3) hemagglutinin/neuraminidase glycoprotein expressed in baculovirus protects calves against experimental BPIV-3 challenge. *Vaccine*, 15(6-7):730-8.
2. Ellis JA (2001). The immunology of the bovine respiratory disease complex. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 17(3):535-50.
3. Nicholas RAJ, Ayling RD (2003). *Mycoplasma bovis*: disease, diagnosis, and control. *Res Vet Sci*, 74(2):105-12.
4. Manfrin A, Friso S, Perin R, Girelli L (1998). Isolation of *Mycoplasma* spp. from cattle in the north-east of Italy. In: *Mycoplasmas of ruminants: pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics volume 2*, Eds Leori G., Santini F., Scanziani E., Frey J., 84-87, European Commission, Brussels.
5. Loria GR, Monteverde V, La Barbera E, Caracappa S, Scanziani E, Grieco V, Ayling RD, Nicholas RAJ (2004). Isolamento di *Mycoplasma bovis* e patologia respiratoria. *Large Animals Review*, 10 (5): 17-21.
6. Scanziani E, Grieco V, Boldini M, Giusti AM, Luini M, Monaci C, Mandelli G (1993). Immunohistochemical identification of *Mycoplasma bovis* in cases of bovine pneumonia. *Atti della società italiana delle scienze veterinarie*, 47: 1065-1069.

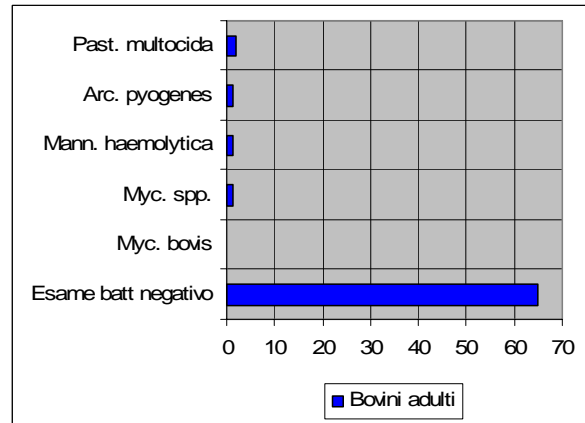
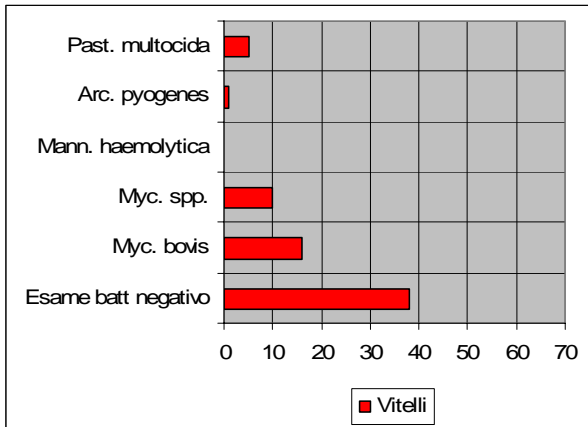


Grafico 1: Risultati dell'esame batteriologico nelle due categorie di animali considerate. Si osserva come *M. bovis*, pur rappresentando l'agente batterico identificato con più frequenza a livello polmonare, sia stato isolato unicamente da campioni provenienti da vitelli.

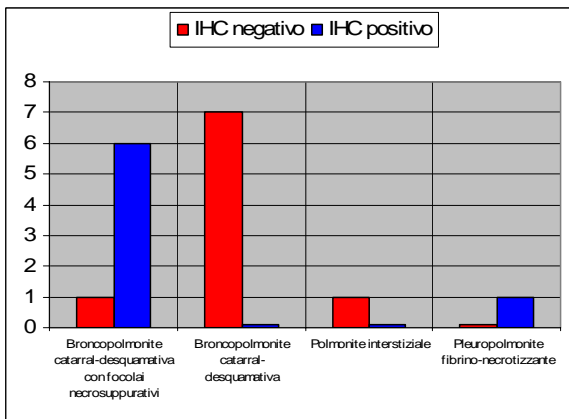


Grafico 2: Relazione tra positività immunostochimica e differenti modelli morfopatologici osservati nei casi batteriologicamente positivi a *M. bovis*. Si noti come la positività all'esame immunostochimico si associ in modo significativo alla presenza di lesioni necrotiche.

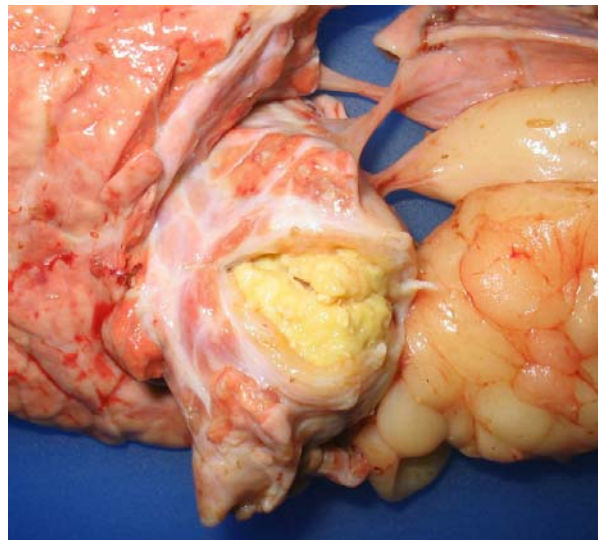


Figura 1: Reperto macroscopico di una lesione ascessuale polmonare contenente abbondante essudato giallastro denso e di aspetto puriforme.

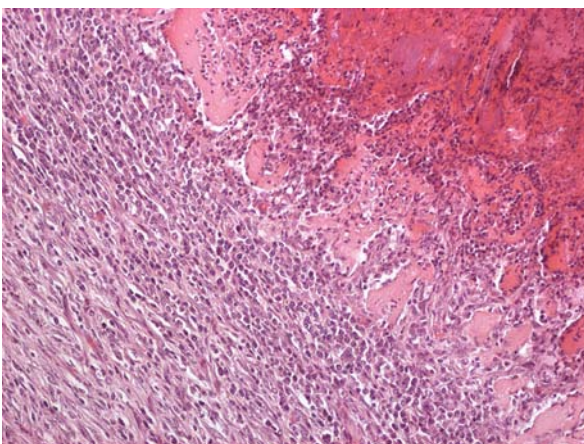


Figura 2: Reperto istologico di pleuropolmonite fibrino-necrotica. Il materiale necrotico appare circondato da abbondante detrito cellulare e marcata fibrosi dei setti interlobulari.

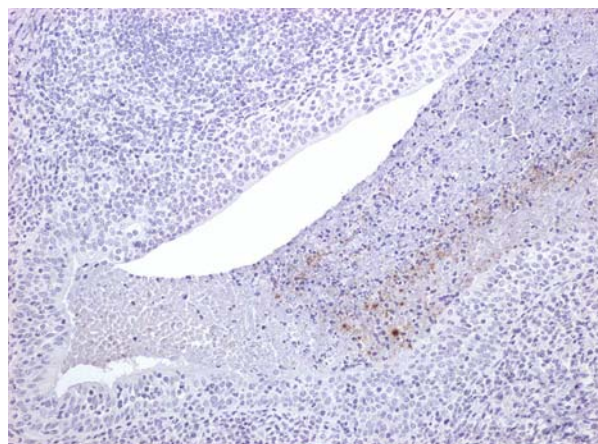


Figura 3: Presenza di antigene riferibile a *M. bovis* frammentato ad abbondante detrito necrotico intrabronchiale.

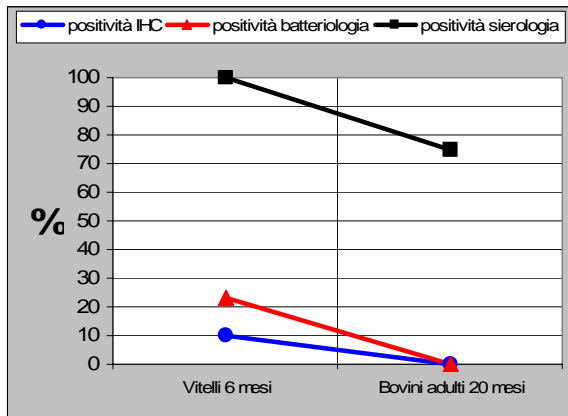


Grafico 3: Dinamica temporale delle diverse valutazioni effettuate. Si noti come i valori delle positività sierologica, batteriologica ed immuistochimica siano inversamente proporzionali all'età degli animali.

MYCOPLASMA BOVIS RESPIRATORY INFECTION IN SLAUGHTERED VEAL CALVES AND BEEF CATTLE FROM NORTHERN ITALY

Mycoplasma bovis is frequently involved in bovine enzootic bronchopneumonia. Current data on the occurrence of *M. bovis* infection in cattle from north Italy are lacking. Aim of this study is to evaluate the role of *M. bovis* in bovine respiratory syndrome in northern Italy.

For this purpose 140 slaughtered cattle (70 6-month-old veal calves and 70 20-months-old beef cattle) from 14 herds located in Lombardy and Piedmont were considered. From each herd 10 animals were selected according to the following criteria: 7 animals with and 3 animals without pneumonic lesions. From each animal lung samples were submitted to bacteriology, histology and immunohistochemical examination for *M. bovis*. Additionally, from each animal a serum sample was obtained and submitted to an ELISA test for anti-*M. bovis* antibodies.

M. bovis was isolated in calves only (16 cases). In calves it represented the most common bacteria isolated in pneumonic lesions. In 14 cases the pathogen was associated with chronic bronchopneumonia. *M. bovis* was detected by immunohistochemistry in 7 cases. All the calves and the majority of cattle were positive to serological examination.

The data of this study indicate that *M. bovis* infection is very common in cattle from northern Italy and that *M. bovis* plays a pivotal role in bovine enzootic pneumonia in northern Italy. The widespread serological positiveness compared to the moderate (calves) or absent (cattle) involvement of *M. bovis* in chronic pneumonic lesions suggest that the infection mostly occurs before the 6 months of age.

Keywords: slaughtered cattle, *Mycoplasma bovis*, pneumonia.

ESPRESSIONE GENICA INDOTTA DAL 17 BETA ESTRADIOLO IN CELLULE STROMALI DI PROSTATA BOVINA: SVILUPPO DI MARCATORI GENICI COINVOLTI NELL'USO ILLEGALE DI PROMOTORI DI CRESCITA

De Maria Raffaella¹, Divari Sara¹, Gorla Mariella², Melasso Chiara¹, Spada Francesca¹, Zancanaro Gabriele³, Iussich Selina¹, Biolatti Bartolomeo¹

¹Dipartimento di Patologia Animale Facoltà di Medicina Veterinaria di Torino. ² Istituto Zooprofilattico del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta. ³Regione Piemonte

Il 17 beta estradiolo è uno degli ormoni sessuali maggiormente impiegati come promotore di crescita nella produzione animale. Esso infatti è in grado di agire nell'apparato riproduttore maschile inducendo iperplasia e metaplasia a livello della ghiandola prostatica, ghiandole bulbo uretrali e uretra. Nella prostata, gli estrogeni agiscono attraverso i recettori alfa presenti nelle cellule stromali che svolgono un ruolo chiave nello sviluppo e nella differenziazione della ghiandola.

Lo scopo di questa ricerca è stato quello di sviluppare un modello *in vitro* rappresentato da cellule stromali di prostata bovina e di valutare in vitro l'effetto sull'espressione genica mediato dal 17 beta estradiolo sui seguenti geni: FGFR1, FGFR2, FGFR3, b-FGF, PR, AR, IGF, VEGF, ER-alpha. L'espressione di questi geni è stata inoltre valutata in prostata di bovini sperimentalmente trattati con estradiolo.

Colture primarie di cellule stromali di prostata bovina sono state allestite in terreno MCDB-131 in presenza e assenza di 17 β -estradiolo a concentrazione 100nM. 3 bovini maschi sono stati trattati sperimentalmente con 17 beta estradiolo ad una concentrazione di 10 mg/animale. L'RNA è stato estratto sia da cellule che da tessuto prostatico e il cDNA è stato soggetto ad analisi di PCR quantitativa per valutare l'espressione genica di diversi geni target.

Il 17 beta estradiolo è in grado di aumentare *in vitro* l'espressione di diversi geni del pathways degli FGFR e in particolare del PR. Il recettore per il progesterone (PR) risulta inoltre over-espresso in tessuto prostatico proveniente da animali trattati sperimentalmente con estradiolo. Esso può quindi essere considerato un marcatore genico riconducibile ad un trattamento con estrogeni.

Parole chiave: bovini, prostata, cellule stromali, 17 beta estradiolo; anabolizzanti

GENE EXPRESSION INDUCED BY 17 BETA ESTRADIOL IN BOVINE PROSTATIC STROMAL CELLS: A WAY FOR THE IDENTIFICATION OF MOLECULAR MARKERS INVOLVED IN THE ILLEGAL USE OF GROWTH PROMOTERS.

17 β -estradiol is one of the most effective sex steroids illegally used as anabolic in animal production, inducing hyperplasia and metaplasia of the genital accessory gland epithelium which are considered important alteration for a primary screening of animals illegally treated with growth promoters. In male, estrogens act through the specific alpha cellular receptors located in the prostatic stromal cells, which play an important role in the development and differentiation of the gland. The purpose of this study was the identification of several genes involved in this process, after *in vitro* treatment with 17 β -estradiol of bovine primary prostatic stromal cells. Cells, were grown in specific medium and treated with 17 β -estradiol at 100nM concentration. Total RNA was extracted and subjected to cDNA synthesis by reverse transcriptase. The expression of genes encoding for bovine FGFR1, FGFR2, FGFR3, b-FGF, PR-R, AR, IGF, VEGF, ER-alpha, desmin, (normally regulated in the human prostatic gland by 17 β -estradiol), was evaluated by a quantitative PCR method. The results show that 17 β -estradiol induces a significant up-regulation of PR-R, FGFR1, FGFR2, FGFR3, IGF and TGF beta. We evaluated also these gene in prostate from bovines experimentally treated by estradiol and we found that gene encoding for PR is up-regulated in this organ.

Keywords: bovine, prostatic gland; stromal cells; 17 beta estradiol; anabolic effects

ALTERAZIONI MACROSCOPICHE E ISTOLOGICHE NEL RENE DI BOVINO AL MACELLO

Aresu Luca¹, Pregel Paola¹, Bollo Enrico¹, Valenza Federico¹, Bono Michela²,
Serenò Alessandra¹, Biolatti Bartolomeo¹

¹Università degli Studi di Torino, Dipartimento di Patologia Animale, Via L. da Vinci 44, 10095
Grugliasco (TO); ²Libero professionista

E' stato effettuato un campionamento su 156 bovini al macello al fine di valutare eventuali correlazioni tra lesioni macroscopiche ed istologiche renali. Sono stati registrati per ogni animale dati riguardanti: età, lesioni macroscopiche a livello renale o a carico di altri organi e ogni trattamento dichiarato in sede di macellazione. All'esame istologico sono state prese in considerazione lesioni a livello tubulare, interstiziale e glomerulare. Si è rilevata una discrepanza tra i risultati dell'esame macroscopico e istologico relativamente alla nefrite interstiziale cronica (NIC): nel 18,5% dei casi che non presentavano lesioni macroscopiche di alcun tipo è stata riscontrata istologicamente NIC, mentre nel 39,6% dei casi in cui la NIC è stata ipotizzata macroscopicamente non si è avuto alcun riscontro istologico. Nella vacca (età superiore ai 5 anni) istologicamente è stata osservata una positività del 41% per la NIC e del 22% per la glomerulosclerosi, lesione esclusiva di tale gruppo di età, indicativa di alterazione senile. Lesioni multifocali di tipo degenerativo a livello dell'epitelio tubulare sono state segnalate nell'83% dei vitelloni e nel 62% dei vitelli a carne bianca (VCB) trattati con molecole derivate da tetracicline, dati molto dissimili dalle percentuali dell'8,5% e del 40% ottenute, rispettivamente, nei vitelloni e nei VCB non trattati. Pertanto, l'assenza di lesioni renali macroscopiche non è significativa in assoluto e si conferma la necessità e l'importanza di un accurato riscontro istologico, in particolare nel caso di nefrite interstiziale cronica. D'altra parte l'esame in toto dell'organo può mettere in evidenza alterazioni che all'esame microscopico, dato il prelievo ridotto, non potrebbero essere rilevate. L'associazione tra l'utilizzo di tetracicline e la comparsa di alterazioni tubulari è ancora oggetto di studio e richiede ulteriori indagini, eventualmente avvalorate da un modello sperimentale.

Parole chiave: rene, bovino, nefrite, tetracicline

GROSS AND HISTOLOGICAL RENAL LESIONS IN CATTLE AT SLAUGHTER

To detect the possible relationship between macroscopic and histological renal lesions, we examined the kidneys of 156 cattle at slaughter. Age, macroscopic alterations in kidneys or in other organs and any legal pharmacological treatment were recorded. Tubular lesions, interstitial damages and glomerular diseases were classified by degree of extension.

Results coming out between the match of macroscopic exams and histological features in chronic interstitial nephritis (CIN) were in some instances not related: 18.5% of kidneys with no gross lesions showed CIN at the histology examination, while 39.6 % of kidneys with relevant nephritis at macroscopic examination resulted normal. In cows (age > 5 years old) CIN was observed on 41% of animals, associated to glomerulosclerosis (22%), were considered to be a lesion common to this group related to the age. Multifocal degenerative lesions were observed in proximal tubules in the 83% of calves and in the 62 % of veal calves legally exposed to tetracycline molecules, while 8.5% of calves and 40% of calves showed degenerative lesions with no indication of pharmacological treatment.

From the analysis of the data examined, the results show the importance of the association of the histology to the gross examination of the kidneys, especially in nephritis. The join of degenerative lesions in tubules and tetracycline is still under examination.

Keywords: kidney, bovine, nephritis, tetracycline

INFEZIONE SISTEMICA LETALE DA CORONAVIRUS IN UN CANE: LESIONI PATOLOGICHE E IMMUNOISTOCHEMICA

Zappulli Valentina¹, Caliarì Diego¹, Cavicchioli Laura¹, Tinelli Antonella²,
Castagnaro Massimo¹

¹Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria, Università di Padova

²Dipartimento di Sanità e Benessere Animale, Università di Bari

Un cocker spaniel maschio di 53 giorni è deceduto dopo due giorni di febbre, letargia, inappetenza, vomito, diarrea emorragica e atassia. All'esame necroscopico si è evidenziata una polmonite lobare grave, degenerazione epatica e splenica multifocale moderata, infarti renali multipli, e moderata infestazione intestinale da ascaridi. All'istologia è stata confermata una grave broncopolmonite fibrinopurulenta, steatosi epatica centrolobulare e lieve necrosi epatica non zonale, emorragie spleniche multifocali con deplezione linfoide diffusa grave e infarti renali multipli. Analisi immunoistochimiche su tessuti viscerali, eseguite mediante l'impiego di un anticorpo monoclonale anti-Coronavirus canino, hanno permesso di evidenziare una positività citoplasmatica diffusa in cellule mononucleate disseminate principalmente a livello epatico, splenico, polmonare e renale. Nei polmoni le cellule positive sono prevalentemente identificabili nelle aree coinvolte dalle lesioni, sia frammisti all'epitelio bronchiolare sia in sede peribronchiale. Mediante tecniche di real-time RT-PCR, sono stati identificati da campioni di contenuto intestinale coronavirus di tipo I e II, mentre unicamente il coronavirus di tipo II è stato identificato a livello viscerale. Colorazioni istochimiche di routine e esami microbiologici non hanno permesso di evidenziare altri agenti eziologici. Questo caso rappresenta la prima descrizione delle lesioni associate a un coronavirus di tipo II letale pantropico nella specie canina.

Parole chiave: coronavirus, cane, immunoistochimica

SYSTEMIC CORONAVIRUS INFECTION IN A DOG: PATHOLOGICAL FINDINGS AND IMMUNOHISTOCHEMISTRY

A male 53-day-old cocker spaniel with fever, lethargy, inappetence, hemorrhagic diarrhoea, vomiting and ataxia died after 2 days. Post-mortem examination revealed extensive lobar pneumonia, severe hepatic and splenic coalescing degeneration and necrosis, and multiple renal infarcts. Some parasites consistent with ascarids were present within the intestine. At histology severe coalescing fibrinopurulent broncopneumonia, centrilobular hepatic fatty change and minimal hepatic random necrosis, splenic multifocal haemorrhages with lymphoid depletion, and renal cortical infarcts were detected. Moderate chronic diffuse enteritis was associated with intraluminal adult ascarids. Immunohistochemistry was performed using a anti-canine-Coronavirus monoclonal antibody. Mononuclear disseminated cells showed a marked diffuse cytoplasmic positivity mainly within the liver, spleen, lungs and kidneys. In the lungs intralesional positive cells were detected both within the bronchiolar epithelium and in peribronchial areas. Type I and type II coronavirus were identified by genotype-specific real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assays in the intestinal content, while only Coronavirus type II was detected in visceral organs. At histochemistry and microbiology no other etiological agents were isolated from visceral organs. This case represents the first description of anatomopathological lesions associated with a type II pantropic fatal coronavirus infection in the dog.

Key words: coronavirus, dog, immunohistochemistry

NEFROPATIE DEI CARNIVORI DOMESTICI: CONFRONTO TRA LE METODICHE ISTOLOGICHE E L'ESAME ULTRASTRUTTURALE

Scaglione Frine Eleonora, Catalano Deborah, Cornaglia Enzo, D'Angelo Antonio, Brovida Claudio*, Zanatta Renato, Capucchio MariaTeresa.

*Universita' degli Studi di Torino. *Libero professionista, Torino*

Le patologie renali degli animali domestici sono riconosciute essere molto più frequenti di quanto si ritenesse comunemente in passato, pertanto anche in medicina veterinaria sta diventando importante la ricerca di metodiche diagnostiche ante-mortem, in particolare per le specie canina e felina.

Il presente studio si è posto come obiettivo quello di confrontare la microscopia ottica ed elettronica a trasmissione (TEM), valutarne le differenze e l'utilità diagnostica per sviluppare un metodo accurato e specifico per la diagnosi intra-vitam delle patologie renali. Gli animali selezionati per la ricerca (n° 30 di cui 14 gatti e 16 cani) erano tutti affetti da patologie renali conclamate o con alterazioni renali minori rilevate per mezzo di analisi delle urine o del sangue. Sono inoltre stati presi in considerazione alcuni soggetti trattati per lungo tempo con farmaci riconosciuti in medicina umana lesivi per il tessuto renale. Tali soggetti sono stati sottoposti a prelievo di tessuto renale mediante biopsia o in sede necroscopica, immediatamente dopo l'eutanasia. Allo stereo microscopio si è poi provveduto alla suddivisione dei glomeruli in due aliquote, la prima delle quali è stata fissata in formalina tamponata al 10%, inclusa in paraffina, sezionata e colorata con ematossilina-eosina, PAS e PASM; la seconda fissata in glutaraldeide 2,5% inclusa in resina Spurr, sezionata all'ultramicrotomo e colorata con metalli pesanti per l'esame ultrastrutturale. Con l'uso del TEM maggiore attenzione è stata posta a livello glomerulare ove è stato possibile osservare alterazioni della capsula di Bowman (formazioni di semilune, calcificazioni, proliferazione cellulare); differenziare patologie glomerulari classificate in ottica come ipercellularità (mesangiale, endoteliale o dei podociti); distinguere precocemente iniziali fenomeni di sclerosi glomerulare da lieve ipertrofia mesangiale. Tutte le componenti della membrana di filtrazione sono risultate inoltre facilmente osservabili consentendo di individuare a quale livello e di che tipo fosse l'alterazione che provocava difetti di filtrazione. A livello tubulare è stato possibile individuare alterazioni delle membrane basali (ispessimenti, calcificazioni, pluristratificazione e degenerazione lamellare) prima che potessero essere visibili in microscopia ottica. In conclusione la microscopia elettronica non dissociata dalle procedure cliniche, dagli esami collaterali, dall'istologia ed eventualmente dall'immunoistochimica si è rivelata un metodo utile ed indispensabile per la diagnosi e la prognosi delle malattie renali dei carnivori domestici.

Parole chiave: nefropatie, cane, gatto, istologia, ultrastruttura

RENAL PATHOLOGIES OF DOGS AND CATS: COMPARISON BETWEEN HISTOLOGY AND ULTRASTRUCTURE

The aim of this study is to compare histology and ultrastructure in renal pathologies of 30 cats and dogs. Glomerular lesions were most investigated by TEM that showed: alterations of the capsule of Bowman before it was manifested in histology; differentiation of cellular proliferation in glomerulus; discrimination of initial glomerular sclerosis and mesangial hypertrophy. Moreover all the components of glomerular basal membrane were observed. In conclusion TEM with clinical proceedings, collateral analysis, histology and immunohistochemistry is a useful and indispensable method for diagnosis and prognosis of renal pathologies.

Keywords: renal pathologies, dog, cat, histology, ultrastructure

L'OSSIFICAZIONE DURALE DEL CANE: RILIEVI MACROSCOPICI ED ISTOLOGICI

Capucchio Maria Teresa, Zagarella Paolo Giovanni, Catalano Deborah, Amedeo Stefano, Sammartano Federica, Scaglione Frine Eleonora, Valenza Federico, Valazza Alberto.

Universita' degli Studi di Torino

L'ossificazione durale e' un processo degenerativo caratterizzato da deposito di placche ossee sulla superficie interna della dura madre spinale. Rappresenta un riscontro frequente nel cane soprattutto negli animali di grossa taglia, adulti e anziani. L'obiettivo di questa ricerca e' indagare tale processo dal punto di vista macroscopico ed istologico. Sono stati esaminati 32 cani, prevalentemente di razza Pastore Tedesco, di eta' compresa tra 4 e 13 anni. Dopo l'isolamento delle colonne in sede necroscopica, i segmenti anatomici sono stati radiografati in toto ed immediatamente sottoposti ad osteotomia onde poter sollevare la porzione dorsale degli archi vertebrali e rimuovere i midolli spinali. E' quindi stata eseguita un'accurata indagine macroscopica al fine di valutare eventuali patologie discali concomitanti e classificare le ossificazioni osservabili. Una parte dei focolai ossificati e' stata fissata in formalina tamponata al 10% e sottoposta ad esame istologico. Per quest'ultima indagine sono state utilizzate due metodiche: la classica decalcificazione e inclusione in paraffina e una procedura senza decalcificazione con inclusione in metilmetacrilato. Tutti i campioni sono poi stati colorati con ematossilina-eosina, Weigert-van Gieson e Pentacromica di Movat. 22 cani hanno mostrato almeno un focolaio di ossificazione, anche se in media ne erano presenti almeno 5. La maggioranza delle placche rilevate erano rettilinee, localizzate in sede lombare, in posizione ventrale o paramediana ventrale rispetto al midollo spinale. Solo 8 erano a guscio in sede cervicale. In merito alla relazione tra protrusioni discali e ossificazioni riteniamo non esista una diretta correlazione tra i due processi. Solo in due casi e' stata osservata una netta impronta sul midollo spinale provocata dall'ossificazione in associazione a fenomeni degenerativi assonali. L'esame istologico senza decalcificazione e' risultato di qualita' nettamente superiore. Ha mostrato placche composte da tessuto osseo lamellare ben organizzato quasi sempre contenenti lacune con cellule emopoietiche midollari all'interno. In genere ai margini delle placche era presente uno strato di tessuto calcificato non ben organizzato diradante verso la dura madre normale. In alcuni campioni erano osservabili aree di tessuto amorfo simil-necrotico e talora vasi neoformati la cui presenza puo' far pensare a processi riparativi post-degenerativi o post-infiammatori. Ulteriori studi sono in corso per approfondire i meccanismi patogenetici del processo di ossificazione la cui origine resta ancora attualmente da definire.

Parole chiave: dura madre, ossificazioni, cane, esame macroscopico, istologia

CANINE DURAL OSSIFICATION: ANATOMO-PATHOLOGICAL INVESTIGATIONS

Dural ossification (DO) is a degenerative disorder of the dog characterized by bone deposition on the inner surface of the spinal dura mater. This study reports the macroscopical and histological features observed in the spinal column of 32 adult dogs. At gross examination 22 animals showed plaques of DO, the majority of them located ventrally to the medulla. Histologically the plaques, often containing marrow cavities, were islands of bone surrounded by connective tissue of the normal dura mater. In some cases necrotic tissue and vessel neoformations were observed near to the DO. Further studies are necessary to better understand the pathogenesis of this process.

Keywords: dura mater, ossifications, dog, macroscopical exam, histology

IDROCEFALO INTERNO ASSOCIATO AD ENCEFALITE PERIVENTRICOLARE IN UNA GIOVANE VOLPE

Pavone Silvia, Vitellozzi Giovanni, Mandara Maria Teresa

*Dipartimento di Scienze Biopatologiche ed Igiene delle Produzioni Animali e Alimentari
Facoltà di Medicina Veterinaria di Perugia*

Viene descritto un caso di idrocefalo associato ad atrofia corticale cerebrale e ad encefalite periventricolare in un cucciolo di volpe di due mesi di età, trovato in grave stato di disorientamento e di denutrizione, con segni di atassia locomotoria, andatura in circolo e cecità. Il quadro clinico è andato progredendo in pochi giorni verso uno stato stuporoso e la morte spontanea dell'animale. L'esame istopatologico del tessuto nervoso encefalico ha messo in evidenza gravi lesioni infiammatorie e necrotiche in sede periventricolare, con la formazione di diverticoli nella regione della capsula interna e della corteccia rinencefalica. Nei ventricoli laterali e nel IV ventricolo era presente una corioidite suppurativa. Indagini di immunoistochimica per *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Encephalitozoon cuniculi* e per il virus del cimurro, così come tests di immunofluorescenza diretta per la rabbia, hanno dato esito negativo. La presenza di una ricca infiltrazione periventricolare e corioidea di tipo neutrogranulocitario e monocitario suggerisce, come possibile causa del processo patologico, una infezione batterica. Una simile condizione idroencefalica è riconosciuta nella patogenesi dell'idrocefalo spontaneo acquisito del cane, ma non ancora mai segnalata nella volpe.

Parole chiave: idrocefalo, encefalite periventricolare, volpe

INTERNAL HYDROCEPHALUS ASSOCIATED TO PERIVENTRICULAR ENCEPHALITIS IN A YOUNG FOX

Marked lateral ventricular enlargement associated with atrophic cerebral cortex and periventricular encephalitis is described in a two-month-old fox, affected by disorientation and bad nutritional state, generalized ataxia and difficulty in walking, circling and blindness. Clinical condition progressed to the stupor and spontaneous death in a few days. Severe inflammatory and necrotizing lesions were observed in periventricular sites along with diverticula in the region of capsula interna and rhinencephalic cortex. Suppurative choroiditis was also observed in the lateral and fourth ventricles. Immunolabelling of *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Encephalitozoon cuniculi*, canine distemper and rabies virus was negative. Since the presence of periventricular and choroidal neutrophilic and mononuclear cell infiltration, a bacterial infection could be admitted may have been the cause of this process. A similar condition has been previously recognized in the pathogenesis of spontaneously occurring acquired canine hydrocephalus, while, to our knowledge, this is the first report of internal hydrocephalus associated to periventricular encephalitis in the fox.

Keywords: Hydrocephalus, periventricular encephalitis, fox

DUE CASI DI MALFORMAZIONE SCHELETRICA IN PULEDRI: PATOLOGIA ED IPOTESI EZIOLOGICHE

Riccaboni Pietro¹, Rondena Marco¹, Zani Davide², Turci Tania³, Zavaglia Giovanni³,
di Giancamillo Mauro², Finazzi Mario¹

¹Dipartimento di Patologia Animale Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria. ²Dipartimento di Scienze cliniche Veterinarie, Università degli Studi di Milano, Polo universitario di Lodi. ³Liberi professionisti

Nel puledro le malformazioni scheletriche hanno incidenza sporadica, sono in prevalenza sistemiche, causano aborto precoce e sono perlopiù ad eziologia incerta o sconosciuta. Sono colpite soprattutto le ossa craniche, la colonna e gli arti; talvolta, in casi particolarmente gravi, la scoliosi congenita è associata a sventramento addominale.

In un piccolo allevamento di cavalli da sella tre fattrici sono state contemporaneamente sottoposte ad embryo transfer. Sul finire del secondo mese di gravidanza, gli alberi circostanti i recinti delle cavalle sono stati trattati con inibitori della sintesi della chitina per il controllo della processionaria (*Hyphantria cunea*). Dopo gravidanze clinicamente normali, le tre cavalle hanno partorito una femmina viva e vitale e due maschi morti ed evidentemente malformati. Su questi, subito conferiti all'Ospedale Veterinario di Lodi, oltre alla necropsia sono stati eseguiti esami radiologici per meglio valutare la morfopatologia scheletrica. In entrambi i soggetti erano presenti gravissime lesioni che nel primo coinvolgevano lo splancnocranio, gli arti anteriori che, per deviazione angolare mediale di tutti i piani articolari, risultavano avvolti a spirale. Lo scheletro assile presentava cifosi e scoliosi marcate, con alterazioni morfologiche di corpi vertebrali e schiacciamento discale. All'autopsia il diaframma risultava fenestrato con conseguente ernia diaframmatica. Nel cuore era persistente un ampio foro interventricolare. Nel secondo puledro erano evidenti lo sventramento addominale (ombelicale) ed una marcantissima lordo – scoliosi. La colonna presentava andamento spiraliforme che coinvolgeva il costato deformandolo. Era inoltre presente idronefrosi monolaterale destra.

Nella presente segnalazione la contemporaneità degli eventi induce ad ipotizzare cause teratogeniche comuni. Tra queste l'esposizione delle fattrici ad un possibile agente tossico nel momento dell'organogenesi e le manipolazioni ormonali correlate all'embryo transfer meritano maggiori approfondimenti anche in base ai dati bibliografici.

Parole chiave: puledro, teratogenesi, malformazioni, scheletro

SKELETAL MALFORMATIONS IN TWO FOALS: PATHOLOGY AND ETIOLOGICAL HYPOTHESIS

Skeletal malformations involve sporadically the foals. These malformations are usually systemic and have of uncertain origin. Three mares of a small saddle horses breeding farm were submitted to embryo transfer procedure. Two month after, due to a severe larval infestation (*Hyphantria cunea*) the farm trees were treated with chitin synthesis inhibitors insecticides. After normal pregnancy the mares foal a normal filly and two death malformed foals. At the necropsy both foals showed skeletal lesions involving severely head and fore limbs in the first one, and the spine and the chest in the second one. Both foals showed fenestration of the abdominal cavity (into the diaphragm and into the ventral abdominal wall) inducing intestinal hernia and eventration respectively. The aim of this communication is to suppose a common pattern able to induce skeletal malformations: we propose to speculate about the potential effects of a drug incidentally assumed in the organogenesis period and the roll of the hormonal manipulation for the embryo transfer procedure.

Key words: foal, malformation, teratogenic agents, skeleton

RABDOMIOSARCOMA EMBRIONALE CON INVASIONE DEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE E METASTASI LINFONODALI IN UN CANE

Rossetti Enrica, Pintore Laura^o, Bernardini Marco*, Castagnaro Massimo*

*Clinica Veterinaria Privata San Marco, Padova. ^oClinica Veterinaria Poggio Piccolo, Castelsampietro, BO. *Facoltà di Medicina Veterinaria, Padova*

Il rhabdomyosarcoma (RMS) rappresenta la più comune neoplasia del tessuto muscolare striato sebbene complessivamente rara e colpisce frequentemente i soggetti giovani.

Un cane Pastore Tedesco maschio intero di 3 anni viene portato a visita perché sbadiglia lamentandosi e stirando il collo. All'esame neurologico: head tilt destro, grave atassia con problemi di stazione, deficit propriocettivi arti anteriori e posteriori, no funzionalità dei nervi facciale e trigemino destri, enoftalmo destro, muscoli masticatori destri atrofici.

Il soggetto è stato sottoposto ad eutanasia con necropsia completa. In cavità orale era presente una formazione coinvolgente l'istmo delle fauci, protrudente, biancastra, infiltrante la base cranica e coinvolgente i linfonodi mandibolari di destra.

Alla citologia della neoformazione la popolazione è rappresentata da elementi di forma poligonale con citoplasma da scarso a moderato basofilo frammentati a scarsi elementi disseminati cariomegalici o multinucleati.

All'esame istopatologico è evidente infiltrazione dei tessuti molli e del sistema nervoso centrale. La popolazione consta di elementi poligonali o fusati disposti perpendicolarmente a tessuto fibroso con citoplasma da scarso ad abbondante a margini sfumati, nucleo pleomorfo vescicolare e 3-8 mitosi atipiche/HPF.

È stata emessa una diagnosi di sarcoma scarsamente differenziato di grado elevato con metastasi linfonodali negativo per striature citoplasmatiche alla colorazione H&E e PTAH.

L'immunohistochimica (IHC) eseguita è risultata positiva per vimentina, actina, desmina, mioglobina.

Sulla base delle caratteristiche anatomicoistopatologiche e la positività IHC è stata emessa una diagnosi di RMS embrionale non parameningeo con infiltrazione del sistema nervoso centrale.

Gli RMS embrionali originano sono comuni nelle regioni della testa e del collo, classificati in medicina umana in orbitali parameningei e non orbitali non parameningei.

L'IHC rappresenta l'indagine diagnostica di elezione e prevede l'impiego di vimentina, desmina, actina, mioglobina, miosina, titina con positività variabile secondo la differenziazione. In medicina umana sono ora in uso i marker: myo D1 e miogenina con risultati incoraggianti in medicina veterinaria. Il caso in questione descrive un'infrequente comportamento biologico del RMS embrionale a localizzazione mista orbitale e non con severo coinvolgimento della base cranica, responsabile dell'atrofia da denervazione della muscolatura masticatoria, confermato mediante IHC.

Parole chiave: cane, rhabdomyosarcoma, embrionale, parameningeo, immunohistochimica

EMBRYONAL RHABDOMYOSARCOMA WITH CENTRAL NERVOUS SYSTEM INVOLVEMENT AND LYMPHONODE METASTASIS IN A DOG

A dog was referred for right-side atrophy of masticatory muscles. The dog was euthanized and a complete necropsy was performed. On examination of the oral cavity, a bulging poorly demarcated mass covered by mucosal surface was infiltrating throughout the brainstem.

Cytological examination revealed a loose population of polygonal to spindle cells and scattered kariomegalic and/or multinucleate cells.

Histological examination revealed a highly infiltrative pattern, with pleomorphic spindloid to polygonal cells, often laying in aggregates against fibrous strands. Neoplastic cells were characterized by scant to abundant cytoplasm, pleomorphic nucleus, hyperchromatic or vesicular chromatin with multiple nucleoli.

A diagnosis of poorly differentiated high grade sarcoma with lymphnode metastasis was made. IHC was performed and a definitive diagnosis of rhabdomyosarcoma was provided by positive staining to muscular markers. This is an infrequent case of mixed orbital and non orbital RMS with SNC involvement and lymphnode metastasis.

Key words: canine, rhabdomyosarcoma, embrional, parameningeal, immunohistochemistry

STUDIO FENOTIPICO E MOLECOLARE DEL TUMORE A CELLULE GIGANTI DELL'OSSO (TCG_O) DEL CANE E DEL GATTO. RISULTATI PRELIMINARI

Leonardi Leonardo¹, Mechelli Luca¹, Benassi Maria Serena², Ciorba Alessandro¹, Brown C. Corrie³, Uhl Elizabeth³

¹ *Dipartimento di Scienze Biopatologiche ed Igiene delle Produzioni Animali e Alimentari, Facoltà di Medicina Veterinaria-Università degli Studi di Perugia, Via San Costanzo, 4 – 06126 Perugia.* ² *Dipartimento Italo Federico Goidanich, Laboratorio di Ricerca Oncologica, Istituti Ortopedici Rizzoli, Via di Barbiano 1/10 - 40136 Bologna.* ³ *Department of Veterinary Pathology, College of Veterinary Medicine, University of Georgia – Athens, GA 30602-7388 – USA*

Il Tumore a cellule giganti dell'osso (TCG_O) è un tumore osteolitico che insorge frequentemente a carico delle epifisi prossimali delle ossa lunghe dello scheletro di animali adulti. Contiene numerose cellule giganti multinucleate omogeneamente distribuite in uno stroma, ben vascolarizzato, di cellule stromali fuse e mononucleate. Diversi studi hanno dimostrato come le cellule giganti multinucleate del TCG_O sono simili agli osteoclasti maturi. Gli osteoclasti vengono formati da precursori circolanti di origine midollare che esprimono un fenotipo monocitario-macrofagico. I tumori benigni e maligni che contengono numerose cellule osteoclasto-simili sono generalmente classificati sulla base della loro morfologia cellulare e della loro localizzazione tissutale. I tumori a cellule giganti possono insorgere nell'osso, nelle articolazioni o nei tessuti molli. I meccanismi con cui le cellule giganti si accumulano all'interno di queste lesioni determinando aree di osteolisi, sia per tumori dell'osso che per tumori di aree adiacenti, non sono ancora stati stabiliti.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di delineare i meccanismi coinvolti nel reclutamento dei precursori osteoclastici in alcuni casi di TCG_O nel cane e nel gatto, individuando alcuni dei processi biomolecolari che ne caratterizzano il comportamento biologico.

Parole chiave: Tumore a cellule giganti, osso, markers, immunoistochimica.

PHENOTYPIC AND MOLECULAR STUDIES OF CANINE AND FELINE GIANT CELL TUMOR OF BONE (GCT_B). PRELIMINARY RESULTS

Giant Cell Tumor (GCT_B) of bone is an osteolytic tumor arising at the epiphyseal end of a long bone in a skeletally mature individual. It contains numerous multinucleated giant cells within a well-vascularized mononuclear spindle cell stroma. Benign and malignant tumors containing multinucleated giant cells have generally been categorized on the basis of tissue localization and histomorphology. The mechanism whereby giant cells accumulate within these lesions and contribute to the osteolysis associated with tumors is not certain. Recent studies of human tumors have shown that the giant cells in GCT_B express the same cell markers as mature osteoclasts, which are formed from bone marrow-derived monocyte/macrophage precursors. The aim of our study was to characterize expression of osteoblastic and osteoclastic cell markers in canine and feline GCT_B.

Key words: Giant cell tumor, bone, markers, immunohistochemistry

Questo lavoro scientifico è stato realizzato anche con il contributo economico del CNR: Consiglio Nazionale delle Ricerche, P.le Aldo Moro, 7 - 00185 Roma.

SCREENING PRE-DIAGNOSTICO DI CAMPIONI CITOLOGICI NON COLORATI COME METODO DI MIGLIORAMENTO DELL'ADEGUATEZZA DELL'ALLESTIMENTO

Masserdotti Carlo

DVM, Dipl ECVCP, Libero Professionista, Brescia

Viene proposto un metodo di screening di allestimenti citologici non colorati, mediante osservazione del campione al microscopio previa chiusura completa del diaframma di campo. Questo tipo di osservazione permette di individuare velocemente campioni con presenza di elementi cellulari potenzialmente diagnostici prima dell'esecuzione di qualsiasi tecnica di colorazione e di distinguerli da campioni acellulari, ematici od esclusivamente detritici. Oltre ad accertare la presenza di cellule diagnostiche, il metodo permette di individuarne i caratteri principali, quali l'appartenza ad una linea flogistica, epiteliale, mesenchimale o rotondocellulare. Il metodo trova applicazione nel migliorare l'adeguatezza di campioni citologici in tutti quei casi in cui è importante evitare la ripetizione del prelievo, soprattutto in pazienti di difficile gestione clinica, quando essi arrivano da lontano, o quando sono sottoposti a procedure anestesologiche. Il riconoscimento di allestimenti cellulari permette inoltre di scegliere quali campioni destinare ad eventuali colorazioni speciali.

Parole chiave: citologia, adeguatezza diagnostica

PRE-DIAGNOSTIC SCREENING OF NON-STAINED CYTOLOGICAL SAMPLES IN IMPROVEMENT OF SMEARS ADEQUACY

A novel method for the screening of unstained cytological samples is purposed. This kind of observation allows to detect the presence of cellular bodies, in order to recognize hematic, acellular and detritic samples before executing the staining procedures. The method is also useful in the detection of the most important morphological presentations, as flogistic or non-flogistic features, and, among the latter, the epithelial, mesenchymal and discrete round cells lineages. The method is suitable in the improvement of adequacy of cytologic samples, whenever it is important to avoid the repetition of the collection, mostly in management of non-collaborative patients, when they are coming from far away or when they underwent anesthetic procedures. Finally, the recognition of cellular samples is useful in selecting the slides to be submitted to special stains.

Keywords: cytology, diagnostic adequacy

ANALISI CITOFLUORIMETRICA DEL PATTERN ANTIGENICO SU ASPIRATI LINFONODALI IN CORSO DI LINFOMA CANINO

Gelain Maria Elena, Mazzilli Maria, Comazzi Stefano

Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Sezione di Patologia Generale e Parassitologia Università degli Studi di Milano

I linfomi, neoplasie molto comuni nel cane, costituiscono un insieme eterogeneo di entità patologiche la cui corretta diagnosi e classificazione è una componente essenziale per la gestione clinica. In medicina umana, la determinazione dell'immunofenotipo rappresenta uno step essenziale, data la correlazione con il comportamento biologico e la risposta alla terapia. Anche in medicina veterinaria studi clinici hanno evidenziato come i linfomi T siano caratterizzati da una prognosi più sfavorevole e una minor risposta alla terapia. L'uso della citofluorimetria per l'immunofenotipizzazione di campioni linfonodali permette di analizzare materiale ottenuto attraverso procedure semplici e non invasive come l'aspirazione con ago sottile (fine needle aspiration, FNA) e, con marcature multiple, possono essere valutate e quantificate le espressioni di più antigeni contemporaneamente. Scopo di questo lavoro è quello di analizzare il pattern antigenico caratteristico di diversi tipi di linfoma canino, identificati secondo schemi classificativi morfologici ed immunofenotipici, valutando la positività ai marker cellulari specifici e definendo le possibili espressioni antigeniche aberranti. In 28 campioni di FNA di linfonodi di cani con linfadenomegalia è stata valutata l'espressione degli antigeni panleucocitari (CD18, CD45), dei principali marker linfoidi (CD3, CD4, CD8, CD21, Cd79a, IgM, IgG), granulocitari e monocitari (CD11b, CD14) e l'espressione di CD34. L'esame citomorfologico dei campioni è stata eseguito secondo la classificazione Kiel update.

Sono stati identificati 16 linfomi B (CD21+ CD79a+), 7 linfomi T positivi ad almeno un marker T (CD3, CD4, CD8) e 2 forme reattive, caratterizzate da popolazioni linfoidi eterogenee e cellule di origine granulocitaria e monocitaria. In tre casi, la presenza di cellule di dimensioni medie, positive a CD34, accanto ad una popolazione residua eterogenea ha permesso di identificare forme di leucemia linfoide acuta (ALL) con interessamento linfonodale. In alcuni casi, si sono notate anomalie fenotipiche come l'espressione contemporanea di marker di cellule B mature (CD21) e antigeni tipici dei blasti (CD34), la negatività a marker panleucocitari (CD45) o la doppia positività a CD4 e CD8 in cellule CD3-. L'analisi citofluorimetrica su FNA si è dimostrata utile per identificare e quantificare in modo corretto le sottopopolazioni linfoidi e determinarne il quadro antigenico con un pannello anticorpale capace di identificare l'origine delle cellule neoplastiche, valutarne il grado di maturazione e evidenziare la contemporanea presenza di antigeni tipici di linee cellulari diverse o quadri antigenici aberranti.

Parole chiave: linfoma, citofluorimetria, immunofenotipizzazione,

INTRODUZIONE

I linfomi canini sono neoplasie comuni e molto eterogenee con presentazioni cliniche e morfologia variabili^(3,10,12). Per questo motivo, una diagnosi il più corretta e precisa possibile è essenziale sia per la prognosi sia per un adeguato approccio terapeutico. In medicina umana è oramai dimostrato come l'associazione tra studio citomorfologico e immunofenotipizzazione delle cellule neoplastiche, con analisi citofluorimetrica, su materiale ottenuto tramite prelievo con ago aspirato (fine needle aspiration, FNA), può fornire la base per una diagnosi e classificazione accurata dei linfomi evitando

tecniche biotipiche invasive^(1,8). Inoltre, con marcature multiple, possono essere valutate e quantificate le espressioni di più antigeni contemporaneamente. In alcuni casi questo permette, non solo di identificare l'origine T o B delle cellule neoplastiche e valutarne il grado di maturazione, ma anche di evidenziare la contemporanea presenza di antigeni tipici di linee cellulari diverse o quadri antigenici aberranti⁽¹⁵⁾, considerati indicatori certi di neoplasia e, in medicina umana, fattori prognostici aggiuntivi^(6,11). Scopo di questo lavoro è stato quello di evidenziare il pattern citofluorimetrico caratteristico dei diversi tipi di linfoma canino, classificati in base ai criteri citomorfologici della classificazione Kiel

updated, valutare eventuali variazioni d'espressione antigenica e identificare possibili espressioni aberranti.

MATERIALI E METODI

Sono stati analizzati 28 campioni di aspirato linfonodale di cani con sospetto diagnostico di linfoma, ottenuto mediante FNA. Sono stati utilizzati, per l'analisi citofluorimetrica, i campioni che presentavano una concentrazione cellulare, determinata con contaglobuli automatica SEAC H8, di almeno 5000 cellule/ μ l. Su i campioni è stata valutata l'espressione degli antigeni panleucocitari (CD18, CD45), dei principali marker linfoidi (CD3, CD4, CD8, CD21, CD79a, IgM, IgG), granulocitari e monocitari (CD11b, CD14) e l'espressione di CD34. I campioni sono stati acquisiti con citofluorimetro a flusso (FACSort, Becton Dickinson) ed analizzati con software specifico Cell Quest. Si è definita come espressione aumentata o diminuita un'espressione antigenica maggiore o minore rispetto ad un controllo interno, rappresentato dalla popolazione normale residua presente nel linfonodo. L'analisi morfologica degli aspirati linfonodali, eseguita sui vetrini colorati con May Grünwald-Giemsa, è stata eseguita con una doppia analisi cieca, in seguito confrontata e uniformata, secondo la classificazione Kiel updated.

RISULTATI

Sono stati identificati 16 linfomi B (CD21+ CD79a+), 7 linfomi T, positivi ad almeno un marker T (CD3, CD4, CD8), 3 forme di leucemia linfoide acuta (2 B-ALL, 1 T-ALL) con interessamento linfonodale e 2 forme reattive, caratterizzate da popolazioni linfoidi eterogenee e cellule di origine granulocitaria e monocitaria. Tra i linfomi B, 15 sono stati classificati come high grade (8 centroblastici polimorfi, 5 centroblastici monomorfi e 1 linfoma linfoblastico) e solo uno come low grade (macronucleolated medium sized cell, MMC). Un caso invece presentava caratteristiche morfologiche non previste dalla classificazione Kiel update. La popolazione neoplastica era, infatti, costituita da cellule

pleomorfe, di grandi dimensioni, con citoplasma chiaro e di quantità moderata, nucleo indentato o convoluto, cromatina dispersa e nucleoli scarsamente visibili. E' stato quindi definito come linfoma pleomorfo a grandi cellule B non classificabile.

Tre linfomi T sono stati considerati high grade (linfomi pleomorfi a grandi cellule), 3 casi low grade (small clear cells, 2 casi CD4+, 1 caso CD8+) e 1 linfoma LGL CD3+CD8+.

Il fenotipo predominante, sia nei linfomi centroblastici polimorfi sia monomorfi, è risultato essere CD45+, CD18+, CD79a+, CD21+. Caratteristica frequente è stata una sottoespressione di CD79a (Fig.1,2), se comparata con il residuo di linfociti B presenti nella popolazione non neoplastica. Espressioni anomale si sono invece riscontrate nel linfoma linfoblastico, risultato CD34+ (fig.3) e nel linfoma pleomorfo non classificabile, le cui cellule neoplastiche sono risultate CD45- e CD34+.

I linfomi T pleomorfi a grandi cellule, in due casi hanno evidenziato, accanto ad un fenotipo CD3+, CD4+, una parziale positività a CD79a, marker della linea B. Nel terzo caso invece, la popolazione neoplastica, oltre ad essere CD45- e CD3-, presentava una contemporanea positività a CD4 e CD8 (fig.4). Nei casi diagnosticati come ALL con coinvolgimento linfonodale, si sono potute identificare le cellule neoplastiche CD34+, accanto ad popolazione residua più ampia ed eterogenea, se confronta con il residuo di norma presente in un linfonodo colpito da linfoma.

DISCUSSIONE

L'uso di tecniche capaci di identificare, quantificare e tipizzare le cellule neoplastiche acquista sempre più importanza per lo studio del linfoma, data l'elevata incidenza di questo tipo di neoplasie nel cane. Nel nostro lavoro, così come precedentemente segnalato^(3,10,12,15), i linfomi B sono risultati le forme più frequenti. Tra questi, il gruppo patologico più comune è stato il linfoma centroblastico pleomorfo, nel quale, l'analisi semiquantitativa dei livelli d'espressione antigenica, ha evidenziato una tendenza alla sottoespressione di CD79a. E' stato inoltre possibile individuare quadri antigenici aberranti come la positività a CD34 in un linfoma linfoblastico e in un linfoma pleomorfo di origine B. L'espressione di CD34 è caratteristica delle leucemie acute, sia

linfoidi sia mieloidi, ed è utilizzata per distinguerle dalle forme croniche o dai linfomi leucemici⁽¹³⁾, ma già altri autori hanno segnalato la possibilità di una sua espressione anomala in corso di linfoma⁽¹⁴⁾. Anche nei linfomi T high grade si sono notate espressioni antigeniche particolari come la coespressione di marker appartenenti a linee cellulari diverse (CD3 e CD79a) o una doppia positività CD4+CD8+ in cellule con evidenti segni d'immaturità, quali la negatività a CD45 e CD3. La presenza di doppie positività anomale è di norma associata ad un'atipica proliferazione dei linfociti T⁽⁵⁾ e a tempi di sopravvivenza ridotti^(7,9).

CONCLUSIONI

In medicina umana, l'uso combinato dell'aspirazione con ago sottile, come tecnica di prelievo citologico, e l'analisi citofluorimetrica ha significativamente influenzato diagnosi, prognosi e terapia delle neoplasie linfoproliferative^(1,5,8,11,16). In medicina veterinaria, al contrario, sono ancora pochi i lavori in cui si utilizzano queste tecniche per la diagnosi e classificazione dei linfomi^(2,4,12,14,15). Lo studio da noi condotto ha evidenziato come l'analisi citofluorimetrica e citomorfologica consenta di diagnosticare il linfoma in tempi brevi, renda possibile una corretta classificazione delle varie entità patologiche e permetta di delineare in modo preciso il quadro antigenico della popolazione neoplastica. La possibilità di usare un ampio pannello anticorpale e di paragonare i livelli di espressione tra popolazione neoplastica e normale, consente inoltre di identificare in modo agevole alterazioni antigeniche qualitative e quantitative, spesso considerate fattori prognostici importanti. La definizione precisa del quadro antigenico delle cellule neoplastiche è inoltre di fondamentale utilità per una stadiazione accurata della patologia, nonché per l'identificazione della malattia minima residua dopo terapia.

BIBLIOGRAFIA

1. Al Shanqeety O et al. The diagnosis of peripheral T cell lymphoma by fine needle aspiration. A cytomorphic and immunophenotypic approach. *Diagn Cytopathol* 2000; 23: 375-379
2. Culmsee K et al. Possibilities of Flow Cytometric Analysis for Immunophenotypic Characterization of Canine Lymphoma. *JVIM* 2001; 47:199–206
3. Fournel-Fleury C et al. Cytohistological and Immunological Classification of Canine Malignant Lymphomas: Comparison with Human non-Hodgkin's Lymphomas. *J Comp Pathol* 1997; 117: 55-59
4. Gibson D et al. Flow Cytometric Immunophenotype in Canine Lymph Node Aspirates. *JVIM*, 2004; 8:710- 17
5. Gorczyca W et al. An approach to diagnosis of T-cell lymphoproliferative disorders by flow cytometry. *Cytometry*. 2002; 15;50:177-90.
6. Jennings CD et al. Recent advances in flow Cytometry; application to the diagnosis of haematologic malignancy. *Blood* 1997; 90: 2863 - 2892
7. Lai R et al. Flow cytometric detection of CD79a expression in T cell acute lymphoblastic leukaemia. *Am J Clin Pathol* 2000; 113:823-830
8. Liu K et al. Diagnosis of hematopoietic processes by fine needle aspiration in conjunction with flow Cytometry: a review of 127 cases. *Diagn Cytopathol* 2001; 24:1–10
9. Pillozzi E et al. Co-expression of CD79a (JCB117) and CD3 by lymphoblastic lymphoma. *J Pathol* 1998; 186:140-143
10. Ponce F et al. Prognostic significance of morphological subtypes in canine malignant lymphomas during chemotherapy. *Vet J*. 2004;167:158-66
11. Schmidt CJ et al. Aberrant antigen expression detected by multiparameter three colour flow Cytometry in intermediate and high grade B-cell lymphomas. *Leuk Lymphoma* 1999; 34: 539 - 544
12. Sozmen M et al. Use of fine needle aspirates and flow cytometry for the diagnosis, classification, and Immunophenotyping of canine lymphomas. *J Vet Diagn Invest* 2005;17: 323-329
13. Vernau W et al. An Immunophenotyping of canine leukemias and preliminary assessment of clonality by polymerase chain reaction. *Vet Immunol Immunopathol* 1999; 69:145–164
14. Wilkerson MJ et al. Lineage differentiation of canine lymphoma/leukemias and aberrant expression of CD molecules. *Vet Immunol Immunopathol* 2005; 106: 179 – 196
15. Williams EL et al. Comparison of results of clinicians' assessments, cytologic examination of fine needle lymph node aspirates, and flow

cytometry for determination of remission status of lymphoma in dogs. JAVMA 2005; 562-566
 16. Zeppa P et al. Fine Needle Cytology and Flow Cytometry immunophenotyping and Sub

classification of Non-Hodgkin Lymphoma: a critical review of 307 cases with technical suggestions. Cancer 2004; 102: 55-65

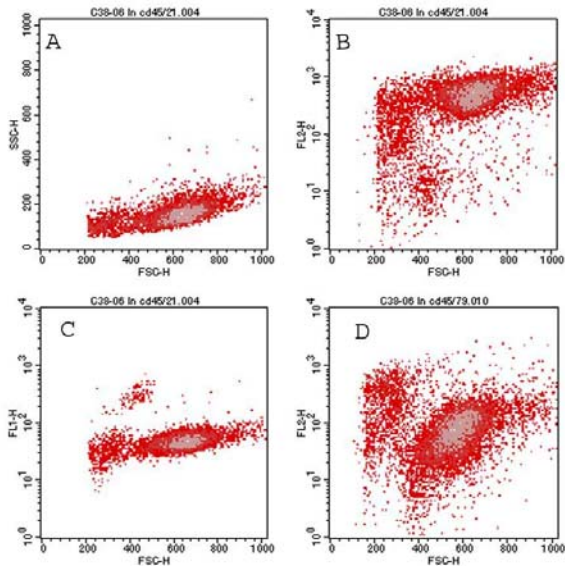


Figura 1. Linfoma centroblastico pleomorfo. Analisi citofluorimetrica. A: forward scatter (FSC)/ side scatter (SSC), B: FSC/CD21 (FL2), C: FSC/CD45 (FL1), D: FSC/CD79a (FL2).

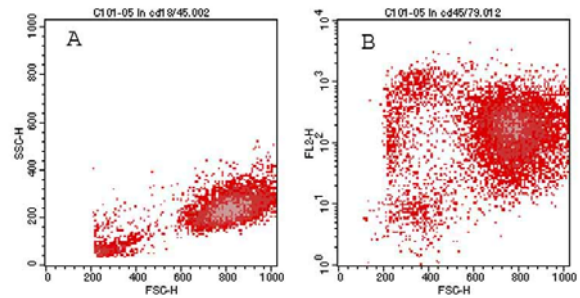


Figura 2. Linfoma centroblastico monomorfo. A: forward scatter (FSC)/ side scatter (SSC), B: FSC/CD79a (FL2).

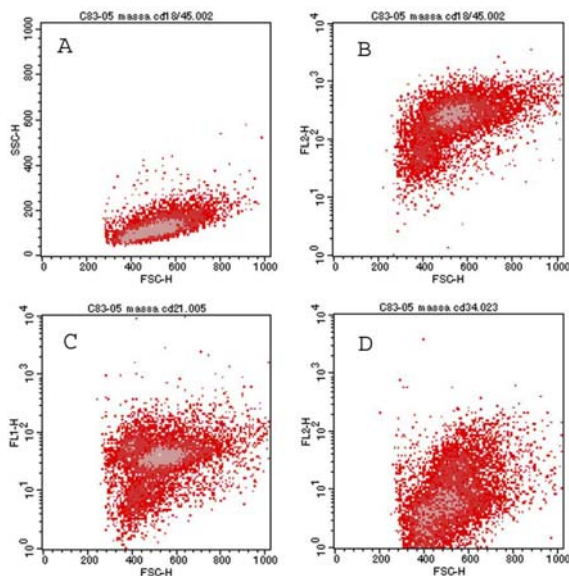


Figura 3. Linfoma linfoblastico. A: forward scatter (FSC)/ side scatter (SSC), B: FSC/CD45 (FL2), C: FSC/CD21 (FL1), D: FSC/34 (FL2).

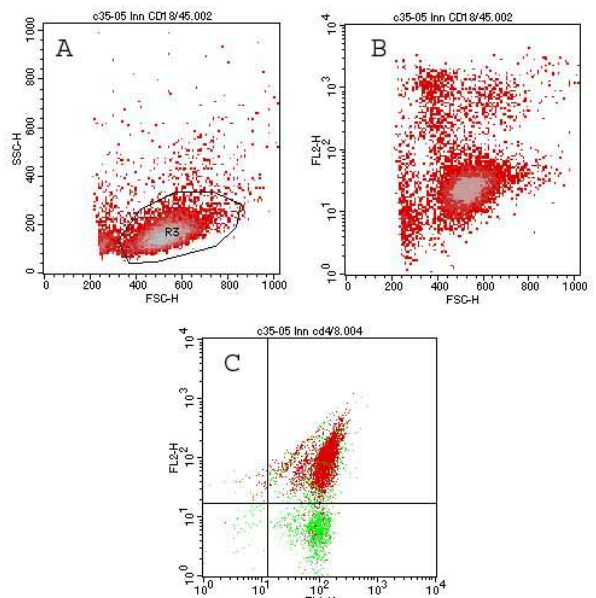


Figura 4. Linfoma T-cell pleomorfo a grandi cellule. A: forward scatter (FSC)/ side scatter (SSC), B: FSC/CD45 (FL2), C: CD4(FL1)/CD8 (FL2).

FLOW CYTOMETRIC EVALUATION OF ANTIGENIC PATTERN IN CANINE LYMPHOMA

The use of fine needle aspiration (FNA) could be useful to evaluate cytomorphologic features and the immunophenotype in canine lymphoma. Twenty-eight FNA of canine lymph node with lymphadenomegalia were analyzed by flow cytometry (FC) to assess the immunophenotype. The morphological criteria for cytology examination were based on the update Kiel classification. 16 B-cell lymphoma, 7 T-cell lymphoma were identified. Two samples were classified as reactive and the presence of CD34+ medium cells in 3 samples were consistent with acute lymphoid leukaemia with lymph node involvement. The use of FC to analyse CD antigen expression on FNA samples could be useful to distinguish lymphoid malignancies to reactive processes and to identify aberrant expression.

Keywords: lymphoma, flow cytometry, immunophenotype

VARIABILITÀ DEGLI INTERVALLI DI RIFERIMENTO DI PARAMETRI ELETTROFORETICI NEL CAVALLO NEONATO IN FUNZIONE DEL TIPO DI PARTO (INDOTTO O SPONTANEO) E DELLA DISTANZA PARTO/PRELIEVO

Giordano Alessia*, Manfrin Margherita*, Massimilano Battocchio**, Sara Panzani**, Paltrinieri Saverio*

*Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Sezione di Patologia Generale e Parassitologia – Via Celoria 10, 20133 Milano. **Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie, Sezione di Clinica Ostetrica e Ginecologica Veterinaria – Via Celoria 10, 20133 Milano

Le informazioni circa gli intervalli di riferimento dei parametri elettroforetici nella specie equina sono scarse. In particolare sono carenti quelle relative al periodo neonatale, quando informazioni precoci sulla presenza di stati patologici possono essere determinanti sulla scelta della terapia e sulla prognosi. In questo studio abbiamo confrontato i parametri elettroforetici di cavalli neonati, campionati alla nascita ed a 1, 3 e 7 giorni di vita, con particolare riferimento al rapporto albumine/globuline (A/G) ed alle percentuali e concentrazioni di globuline α e β - γ . Tali parametri sono stati valutati in 12 cavalli nati con parto spontaneo e in 17 cavalli nati con parto indotto. In linea generale, gli intervalli di riferimento registrati con parto spontaneo sono risultati sempre più ampi di quelli rilevati dopo parto indotto, i quali, peraltro, presentavano più frequentemente outliers. I due gruppi erano spesso caratterizzati da valori significativamente differenti: nel prelievo alla nascita le concentrazioni e le percentuali di β - γ globuline sono risultate più alte ed il rapporto A/G più basso nei cavalli con parto spontaneo. Già al primo giorno di vita però, si assiste ad un aumento delle β - γ globuline, verosimilmente dovuto all'assunzione di colostro e, nei puledri con parto indotto, anche delle globuline α . Tali differenze tendono ad annullarsi dal terzo giorno post-partum. In conclusione, nel valutare l'eventuale presenza di stati patologici nei primi tre giorni di vita, è estremamente importante utilizzare intervalli di riferimento diversi da quelli utilizzabili nei periodi successivi, soprattutto in cavalli con parto indotto, nei quali la concentrazione di tutte le classi elettroforetiche esaminate è notevolmente differente da quella rilevabile dopo il terzo giorno di vita.

Parole chiave: intervalli di riferimento, cavallo, elettroforesi, parto

INTRODUZIONE

Il tipo di parto ed il periodo neonatale sono elementi critici per lo sviluppo di puledri sani e vitali. L'adozione di protocolli di parto indotto efficaci può minimizzare il rischio di distocia e di patologie neonatali quali le asfissie da parto e le setticemie neonatali. In caso di patologie del puledro, l'utilizzo di indicatori biologici in grado di identificare precocemente le patologie stesse può rappresentare un utile mezzo di intervento, garantendo l'adozione di protocolli terapeutici specifici prima che le condizioni generali del soggetto siano compromesse. Le informazioni relative all'influenza del tipo di parto su parametri biologici importanti sotto il profilo diagnostico sono però assenti. Sono altresì scarse le segnalazioni circa gli intervalli di riferimento dei profili elettroforetici, sia di animali sani che di soggetti patologici e mancano informazioni anche riguardo l'utilizzo di marcatori proteici di patologia nella specie equina, soprattutto nel periodo

neonatale, quando un'analisi semplice come l'elettroforesi potrebbe fornire importanti informazioni circa l'avvenuta assunzione di colostro, la presenza di stati patologici ed indicazioni utili per il monitoraggio delle terapie e riguardanti la prognosi. Alla luce di quanto esposto appare necessario implementare le informazioni disponibili, anche in funzione del tipo di parto. Scopo di questo lavoro è acquisire informazioni relative al quadro elettroforetico del cavallo neonato, e valutare se tali parametri variano in funzione del tempo intercorso dal parto al prelievo e del tipo di parto (indotto con ossitocina o spontaneo).

MATERIALI E METODI

Sono stati analizzati 29 puledri neonati di cui 17 nati in seguito a parto indotto con ossitocina (gruppo A) e 12 nati in seguito a parto spontaneo (gruppo B). Da ogni animale sono

stati prelevati 5 ml di sangue in provette contenenti litio eparina. In seguito a centrifugazione è stato ottenuto il plasma che è stato utilizzato per la misurazione delle proteine totali mediante metodica al biuretto, utilizzando un analizzatore automatico (ILAB 300plus, IL) e per l'esecuzione di elettroforesi delle proteine, mediante un analizzatore automatico (Genio, Interlab) che utilizza strisce di poliacetato di cellulosa colorate con rosso ponceau e analizzate mediante un densitometro interno. La lettura densitometrica ha permesso di separare le seguenti classi elettroforetiche: albumine, α_1 , α_2 , β_1 , β_2 , γ globuline. Dato, però, che la separazione tra le due sottoclassi di α -globuline, soprattutto nei prelievi alla nascita, non era sempre evidente, in sede di analisi ed interpretazione dei risultati è stato considerato solo il valore di α -globuline totali. Allo stesso modo, dato che, per evitare un campionamento eccessivo di sangue, l'elettroforesi è stata eseguita su plasma (utilizzabile anche per altre indagini non oggetto del presente lavoro) e non su siero, e che nel plasma è presente fibrinogeno che crea un ponte tra β_2 e γ -globuline e che la distinzione tra queste due sottoclassi era particolarmente labile, soprattutto alla nascita e fino all'assunzione del colostro, quando i puledri sono praticamente privi di globuline γ , le β_2 e le γ -globuline sono state considerate insieme come unica classe β - γ .

RISULTATI

Ad ogni tempo di prelievo, i cavalli nati con parto indotto appaiono caratterizzati da una distribuzione omogenea dei valori, anche se alcuni animali si comportano da outliers, evidenziando valori lontani dall'intervallo che racchiude la maggioranza della popolazione. Si riscontra una tendenza all'aumento dal primo all'ultimo prelievo per quanto riguarda proteine totali, globuline e frazioni globuliniche ed alla diminuzione per quanto riguarda albumine (soprattutto in percentuale) e rapporto A/G. L'esame dei dati evidenzia come, già al primo giorno di vita si assista ad un aumento significativo di proteine totali e ad una diminuzione del rapporto A/G, dovuto all'aumento delle globuline, e in

particolare delle β - γ , mentre le albumine non diminuiscono significativamente in valore assoluto. Nei prelievi successivi, i valori di proteine totali, albumine e β γ -globuline restano costanti sia in termini percentuali che assoluti, mentre si assiste ad un progressivo aumento delle α -globuline, fino ad una settimana di vita (Figura1).

La distribuzione dei valori nel gruppo dei cavalli nati con parto spontaneo sembra essere molto più ampia, soprattutto nei prelievi al giorno 0 e 1 e risulta meno evidente la presenza di outliers. Per questo motivo alcune differenze presenti tra i diversi prelievi del gruppo A, in questo caso non sono statisticamente significative, probabilmente a causa dell'elevata variabilità individuale. In questo gruppo, il quadro relativo alle albumine è simile a quello descritto nel gruppo A, mentre è profondamente diverso quello relativo alle globuline, le quali, pur aumentando significativamente in percentuale, non mostrano un evidente aumento in valore assoluto, in quanto l'aumento delle α -globuline descritto nel gruppo A è assente e l'entità e la significatività dell'aumento della frazione β - γ sono molto inferiori (Figura2). Una delle spiegazioni di questa minore tendenza all'aumento delle globuline β - γ (che risultano comunque aumentate dopo l'assunzione del colostro), può risiedere nel fatto che già alla nascita la concentrazione media di questa frazione proteica era relativamente elevata.

DISCUSSIONE

L'andamento dei parametri proteici dal giorno 0 al giorno 7 nel gruppo A evidenzia un progressivo incremento delle β γ -globuline, verosimilmente imputabile all'assunzione di colostro. L'aumento delle globuline nel periodo post-natale può quindi esser utilizzato per valutare l'avvenuto trasferimento dell'immunità passiva materna¹. L'altro parametro di cui si evidenziano aumenti significativi è rappresentato dalle α -globuline, che al primo giorno di vita mostrano valori sovrapponibili a quelli rilevabili alla nascita, mentre nei prelievi successivi mostrano un aumento progressivo, tanto che il valore al

giorno 3 non solo è significativamente più elevato di quello alla nascita, ma anche di quello al giorno 1 e, allo stesso modo, il campione prelevato al giorno 7 è significativamente superiore a quello rilevato ai giorni 0, 1 e 3. Questo andamento denota una sorta di produzione continua di α -globuline. All'interno di questa classe elettroforetica migrano prevalentemente proteine infiammatorie. Il coinvolgimento di queste proteine è altamente probabile in organismi che entrano per la prima volta in contatto con l'ambiente esterno e che fino all'assunzione del colostro sono scoperti da un punto di vista immunitario in un momento in cui le "porte di ingresso" ai patogeni sono numerose (es: cordone ombelicale, apparato digerente, ecc.). Pur in assenza di patogeni specifici è molto probabile che il contatto con antigeni non specifici quali i normali contaminanti ambientali, possa evocare una risposta infiammatoria altrettanto generica. La più comune risposta sistemica in queste circostanze è rappresentata dalla reazione di fase acuta², nell'ambito della quale vengono prodotte, proteine di fase acuta che migrano tra le α_2 -globuline³. Va però tenuto presente che tali proteine aumentano non solo in corso di infiammazione, ma anche in seguito a stress o comunque ad increzione di glicocorticoidi, situazione che caratterizza il parto ed anche il post-partum.

Per quanto riguarda i cavalli del gruppo B, non è stato evidenziabile l'aumento progressivo delle α -globuline totali descritto nel gruppo A: dato che il valore di partenza sembra essere quantitativamente sovrapponibile a quello del gruppo A, e se l'interpretazione dell'aumento delle globuline α formulata per il gruppo A (presenza di stimoli infiammatori aspecifici) è corretta, è possibile ipotizzare che i puledri del gruppo B abbiano subito, dopo la nascita, minori stimoli infiammatori, forse anche a causa di una maggiore protezione anticorpale dovuta al valore medio di $\beta\gamma$ -globuline registrato al giorno 0 che era già elevato.

CONCLUSIONI

A partire dal terzo giorno post-partum, quando anche i cavalli con parto indotto vengono esposti alle stesse sollecitazioni ambientali rilevabili nei soggetti nati con parto spontaneo, le differenze riscontrate tra i due gruppi tendono ad annullarsi (Figura 3). In entrambi i gruppi è stato rilevato un progressivo aumento dal giorno della nascita al settimo giorno di vita delle proteine totali, imputabile ad un aumento delle globuline α , ed in particolare della frazione $\beta\gamma$, principalmente dovuto all'assunzione del colostro. Entrambi tali aumenti sono risultati più imponenti nei cavalli nati con parto indotto, che presentavano livelli di globuline α e $\beta\gamma$ alla nascita inferiori rispetto a quelli presenti nei cavalli nati con parto spontaneo, i quali probabilmente sono soggetti a stimoli infiammatori maggiori durante il parto stesso. Da questi risultati appare evidente la necessità di disporre di intervalli di riferimento per i cavalli neonati specifici per i primi 3 giorni di vita e che tengano conto del tipo di parto.

BIBLIOGRAFIA

1. Jain NC The Plasma Proteins, Dysproteinemias, and Immune Deficiency Disorders in *Schalm's Veterinary Hematology* di Jain NC 4a ed., cap. 34, pp. 940-89, Lea & Febiger, Philadelphia, PA, 1986
2. Bochsler PN, Slauson DO Inflammation and Repair of Tissue in *Mechanism of Disease. A textbook of comparative general pathology*, di Slauson DO, Cooper BJ, 3a ed., cap.4, pp.140-245, Mosby, St. Louis, 2002
3. Gruys E, Toussaint MJM Monitoring animal hygiene, welfare and health by analytes of the acute-phase reaction. Non specific assessment of infection, inflammation, bruising, stress and starvation. *19^a meeting ESVP*, 25-28 settembre 2001, pp. 113-31, Salonicco, Grecia, 2001

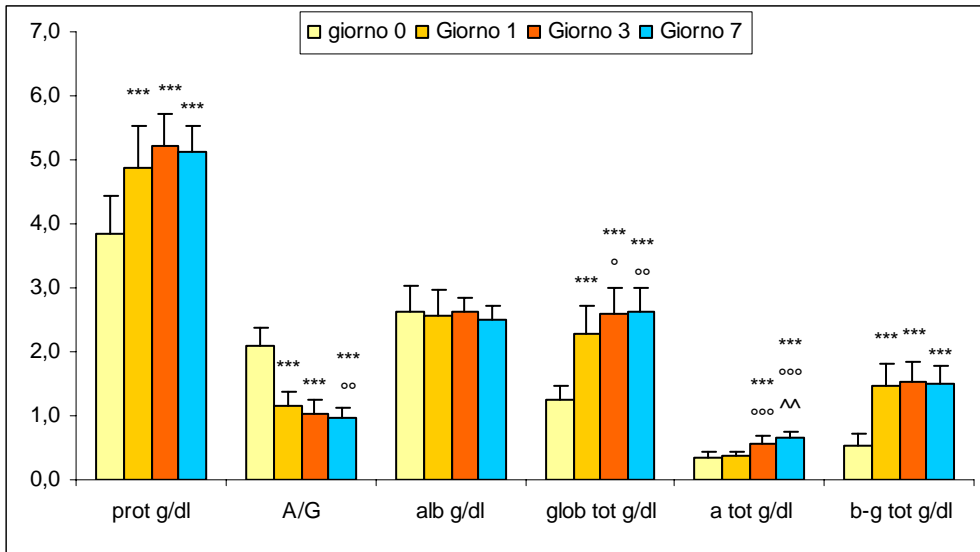


Figura 1. Concentrazioni proteiche e delle diverse frazioni elettroforetiche espresse in valore assoluto (media \pm D.S.) relative ai cavalli del gruppo A.
 Legenda: *** = P<0,001 vs giorno 0; $\circ\circ$ = P<0,001 vs giorno 1; \circ = P<0,01 vs giorno 1; \circ = P<0,05 vs giorno 1; \wedge = P<0,01 vs giorno 3.

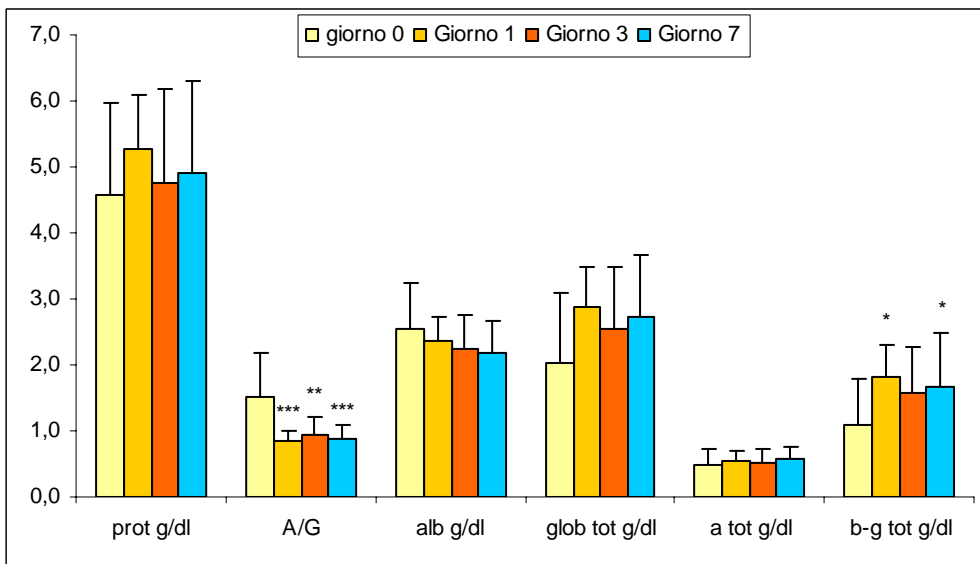


Figura 2. Concentrazioni proteiche e delle diverse frazioni elettroforetiche espresse in valore assoluto (media \pm D.S.) relative ai cavalli del gruppo B.
 Legenda: *** = P<0,001 vs giorno 0; ** = P<0,01 vs giorno 0; * = P<0,05 vs giorno 0.

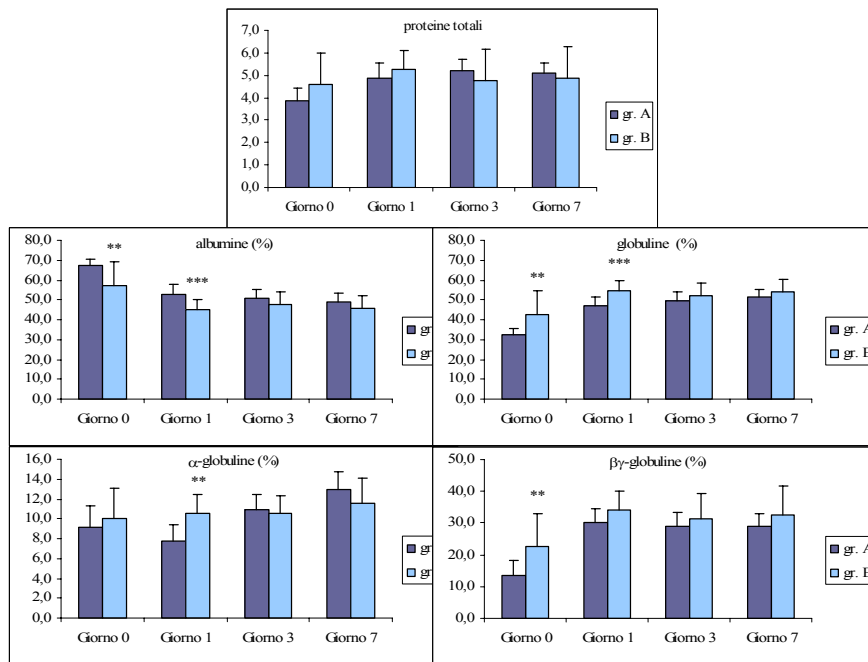


Figura 3. Valori percentuali di proteine totali, albumine, globuline, α -globuline e $\beta\gamma$ -globuline nei due gruppi nei diversi prelievi.

Legenda: *** = $P < 0,001$; ** = $P < 0,01$.

VARIABILITY OF REFERENCE INTERVALS OF ELECTROPHORETIC PARAMETERS OF NEWBORN FOALS: INFLUENCE OF TYPE OF PARTURITION (SPONTANEOUS VS. INDUCED) AND OF INTERVAL BETWEEN PARTURITION AND SAMPLING

Few information about reference intervals (RI) of electrophoresis in horses are available, in particular for newborns, in which early information about the presence of diseases could influence the prognosis. In this study, we compared albumin/globulin (A/G) ratio, α and β - γ globulin concentration of newborn foals at birth and after 1, 3 and 7 days. These parameters were evaluated in horses born with both spontaneous ($n=12$) and induced ($n=17$) parturition. RI recorded after spontaneous parturition were wider than after induced parturition. The latter were often characterized by the presence of outliers. Some globulin fractions were significantly different between the two groups, with higher concentrations and percentages of β - γ globulins and lower A/G ratio at birth in foals born by spontaneous parturition comp to foals born by induced parturition. In the following days, β - γ globulins increased, likely due to colostrum intake. In horses born by induced parturition also α globulins increased. All these differences disappeared from day 3 after parturition. In the evaluation of the possible pathological changes in the first 3 days after birth, is thus extremely important to employ RI different from those used in other periods, in particular in foals born with an induced parturition, in which the concentration of all the examined electrophoretic classes is strongly different by day 3 after parturition.

Keywords: reference intervals, horse, electrophoresis, parturition

CORONAVIROSI E RISPOSTA IMMUNITARIA: RISULTATI PRELIMINARI SULLA CONCENTRAZIONE SIERICA DI INTERFERONE- γ IN GATTI SINTOMATICI E NON

Giordano Alessia, Gelain Maria Elena, Tagliabue Serena, Paltrinieri Saverio

Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Sezione di Patologia Generale e Parassitologia – Via Celoria 10, 20133 Milano

Il ruolo dell'interferone- γ (IFN- γ) nella patogenesi della peritonite infettiva felina (FIP), malattia sostenuta da coronavirus felino (FCoV), è controverso: l'espressione di mRNA codificante per IFN- γ appare elevata nei leucociti circolanti di gatti FCoV-positivi clinicamente sani, ma bassa in quelli di gatti con FIP, i quali presentano però un'elevata espressione di IFN- γ a livello di tessuti. Sembra quindi che la produzione sistemica di IFN- γ ma non quella locale, protegga dalla patologia. Non sono però disponibili informazioni sull'effettiva quantità di IFN- γ circolante, che in ultima analisi, è l'unico indicatore attendibile del livello di IFN- γ funzionale prodotto. In questo studio abbiamo quindi valutato, mediante ELISA specifico per IFN- γ felino, la concentrazione di tale molecola nel siero di 8 gatti clinicamente sani FCoV-positivi provenienti da due allevamenti a diversa prevalenza di FIP e campionati 2 volte ciascuno, e nel siero e nel versamento di 11 gatti con FIP. Le concentrazioni sieriche di IFN- γ nei gatti con FIP ($54,5 \pm 38,0$ pg/ml) sono risultate inferiori a quelle rilevate nei gatti asintomatici viventi in allevamenti a bassa prevalenza di FIP ($102,7 \pm 50,7$, $P < 0,05$), ma non a quelle rilevate in gatti asintomatici viventi in allevamenti ad alta prevalenza di FIP ($65,8 \pm 38,0$). Tale riscontro sembra confermare l'importanza di alti livelli di interferone circolante nel proteggere gli animali dalla malattia. La concentrazione di IFN- γ nel versamento è risultata caratterizzata da elevata variabilità, ma sempre più elevata ($3279,1 \pm 5419,6$ $P < 0,001$) di quella nei sieri corrispondenti a suggerire la presenza di una produzione locale di IFN- γ .

Parole chiave: coronavirus felino (FCoV), peritonite infettiva felina, interferone-gamma, ELISA, patogenesi

INTRODUZIONE

La peritonite infettiva felina (FIP) è una patologia sostenuta da un coronavirus (FCoV) che è indistinguibile sierologicamente, ma anche geneticamente dal coronavirus enterico felino (FECV)¹. Le differenze principali tra le due entità virali risiedono nel loro tropismo cellulare e di conseguenza nella patogenicità. Infatti il FECV mostra uno spiccato tropismo per gli enterociti, all'interno dei quali si replica ed una volta lisate le cellule si riversa nel lume intestinale per andare a colonizzare altri enterociti ed eventualmente viene eliminato nell'ambiente senza provocare lesioni evidenti. Il FCoV responsabile della FIP, invece, una volta superato l'epitelio intestinale, viene processato dalle cellule dendritiche e dai macrofagi presenti nei linfonodi regionali ed utilizza queste cellule per raggiungere le diverse sedi dell'organismo dove più frequentemente si possono ritrovare le lesioni tipiche di questa patologia. Il sistema immunitario svolge quindi un ruolo di primaria importanza nella patogenesi di questa malattia.

In presenza infatti di un'efficiente risposta umorale ma soprattutto cellulo-mediata, l'organismo sembra in grado di difendersi dal virus contrastandone la replicazione ed eventualmente eliminandolo. Se invece l'immunità umorale non è accompagnata da un'altrettanto efficace risposta cellulo-mediata, si possono sviluppare fenomeni di ipersensibilità di III tipo con formazione di immunocomplessi che possono provocare le vasculiti tipiche della FIP essudativa. Se infine la produzione di immunocomplessi non è imponente e prevale la risposta cellulo-mediata può svilupparsi invece un'ipersensibilità di IV tipo con formazione dei granulomi che caratterizzano la forma 'secca' della patologia². In particolare i linfociti T helper giocano un ruolo centrale nella modulazione del tipo di risposta immunitaria, determinando l'attivazione dei differenti tipi cellulari coinvolti nelle diverse risposte, in base all'attivazione ricevuta ed al tipo di citochine secrete.

In particolare l'espressione del mRNA dell'interferone gamma felino (γ -IFN) è stato

oggetto di diversi studi riguardanti la FIP³. In questi lavori è stato trovato come nel siero di animali affetti dalla patologia conclamata, la concentrazione di γ -IFN fosse significativamente inferiore a quella presente nel siero di gatti persistentemente positivi al coronavirus ma clinicamente sani⁴. Questo risultato ha fatto ipotizzare un ruolo protettivo di questa citochina nei confronti di questa patologia. È stato inoltre riscontrato come l'espressione di mRNA fosse significativamente maggiore a livello dei tessuti colpiti e delle lesioni di animali infetti rispetto al siero degli stessi animali⁵. Tutti questi studi, tuttavia, hanno sempre valutato l'espressione dell'mRNA all'interno della cellula, mentre non esistono informazioni sull'effettiva quantità di proteina funzionale che viene prodotta, né su quanta ne viene rilasciata dalla cellula. A differenza dei lavori precedentemente esistenti in letteratura, nei quali venivano utilizzate metodiche di RT-PCR ed immunostochimiche per la ricerca e valutazione semi-quantitativa dell'mRNA di γ -IFN felino, nel nostro studio abbiamo valutato la concentrazione di proteina funzionale circolante nel siero di animali positivi al coronavirus, ma clinicamente sani e di gatti con la patologia conclamata, nei quali è stata valutata inoltre la concentrazione di γ -IFN presente nel versamento.

MATERIALI E METODI

Sono stati valutati 8 gatti FCoV positivi, ma clinicamente sani, 4 dei quali provenienti da un allevamento caratterizzato da una bassa prevalenza di FIP, mentre i restanti 4 provenivano da un allevamento con una prevalenza elevata di casi di FIP. Questi gatti sono stati prelevati 2 volte a distanza di un mese. Sono stati inoltre valutati 11 gatti con FIP conclamata (confermata successivamente mediante esame post-mortem ed esami istologici ed immunostochimici) dei quali è stata valutata la concentrazione di γ -IFN nel siero e nel versamento. Per la determinazione della concentrazione del γ -IFN felino è stato utilizzato un kit ELISA (Feline IFN- γ Duo Set ELISA, R&D) seguendo le istruzioni della casa produttrice.

RISULTATI

Confrontando i risultati ottenuti nei tre gruppi, è stato possibile evidenziare come i gatti provenienti da un allevamento caratterizzato da bassa prevalenza di FIP mostrassero sempre livelli sierici di IFN- γ superiori sia ai gatti asintomatici provenienti dall'allevamento con alta prevalenza di FIP, sia in modo significativo, rispetto ai gatti malati (Figura 2). Inoltre, nei prelievi ripetuti era evidente che in entrambi i gruppi di gatti asintomatici, i livelli di IFN- γ nel secondo prelievo erano sempre inferiori rispetto al primo campionamento, anche se in modo non statisticamente significativo (Figura 1). Per quanto riguarda i gatti con FIP sintomatica, è stato possibile evidenziare come la concentrazione di IFN- γ fosse sempre più elevata all'interno dei versamenti rispetto ai livelli sierici, sia come valori medi, sia confrontando versamento e siero di ogni singolo animale (Figura 3). Purtroppo l'elevata variabilità riscontrata non ha permesso di evidenziare statisticamente queste differenze.

DISCUSSIONE

I risultati ottenuti hanno permesso di osservare che i gatti asintomatici provenienti da un allevamento caratterizzato da bassa prevalenza di FIP avessero sempre livelli sierici di interferone- γ superiori sia ai gatti malati, sia a quelli asintomatici ma provenienti da allevamenti in cui la prevalenza di FIP era più elevata, lasciando ipotizzare che questa citochina possa rivestire un ruolo di protezione nei confronti di questa patologia, confermando l'ipotesi che lo stato immunitario del soggetto giochi un ruolo fondamentale nello sviluppo di tale patologia. Inoltre il confronto delle concentrazioni di interferone a livello sierico e all'interno dei versamenti ha potuto confermare i lavori precedenti, dove era stata riscontrata un'alta espressione di mRNA a livello delle lesioni, portando alla conclusione che questa citochina venisse prodotta a livello locale. Questa ipotesi sembra confermata dai nostri risultati che evidenziano come non solo vi sia un'elevata espressione di mRNA di interferone- γ a livello locale, ma che la

proteina viene efficacemente rilasciata dalle cellule che la producono.

CONCLUSIONI

I dati preliminari riportati in questo studio hanno permesso di confermare i risultati riportati in lavori precedenti riguardanti l'espressione di mRNA di interferone gamma in gatti sani e affetti da FIP, suggerendo che all'espressione di mRNA segua anche la produzione e il rilascio di proteina funzionale. E' stato inoltre ipotizzato il possibile ruolo protettivo di questa citochina nei confronti della malattia, dal momento che anche i nostri risultati hanno evidenziato come i gatti malati avessero sempre concentrazioni di interferone γ inferiori rispetto a gatti esposti al virus, ma che non hanno mai sviluppato la patologia. Infine è stato possibile confermare che questa citochina viene prodotta a livello locale, in quanto nei gatti malati sono state riscontrate concentrazioni superiori a livello dei versamenti che non in circolo. Dal momento che abbiamo riscontrato un'elevata variabilità individuale e che comunque il nostro campione era composto da un numero ridotto di soggetti, per dare maggiore forza ai nostri risultati si rende necessario ampliare la casistica ed

estendere lo studio anche a soggetti affetti da patologie infiammatorie diverse dalla FIP e da patologie non infiammatorie.

BIBLIOGRAFIA

1. Herrewegh A. A. P. M et al. Polimerase chain reaction (PCR) for diagnosis of naturally occurring feline coronavirus infections. *Feline Practice* 23: 56-60, 1995.
2. Paltrinieri S. et al. Type IV hypersensitivity in the pathogenesis of FIPV induced lesions. *Journal of Veterinary Medicine B* 45: 151-159, 1998a
3. Gunn-Moore D.A. et al. Antibody and cytokine responses in kittens during the development of feline infectious peritonitis (FIP). *Veterinary Immunology & Immunology* 65 (2/4): 221-242, 1998
4. Dean G.A. et al. In vivo cytokine response to experimental feline infectious peritonitis virus infection. *Veterinary Microbiology* 97:1-12. 2003
5. Berg A.L. et al. Cellular composition and interferon- γ expression of the local inflammatory response in feline infectious peritonitis (FIP). *Veterinary Microbiology* 111:15-23. 2005

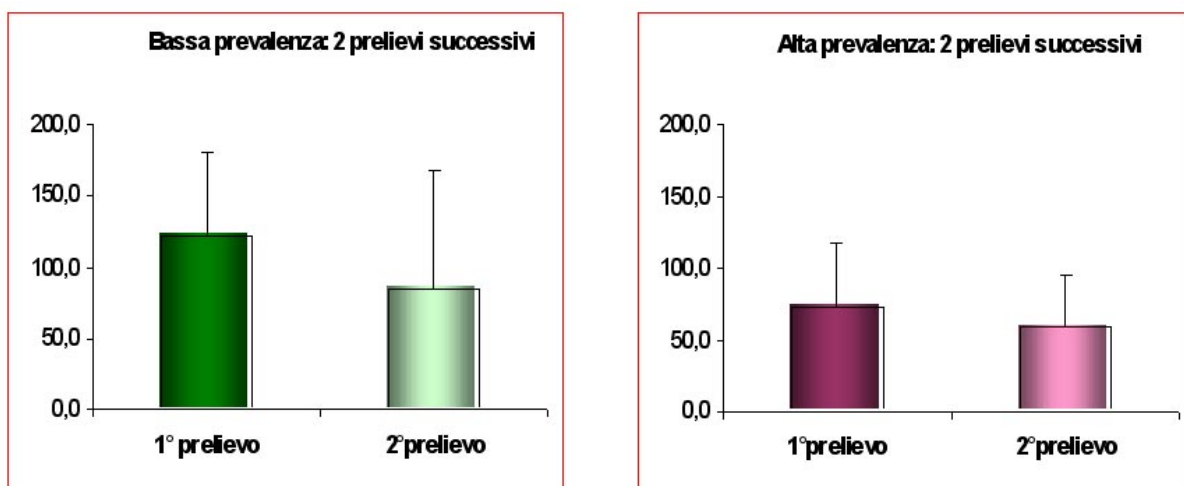


Figura 1. Concentrazione di interferone- γ . Confronto tra prelievi successivi nei gatti asintomatici

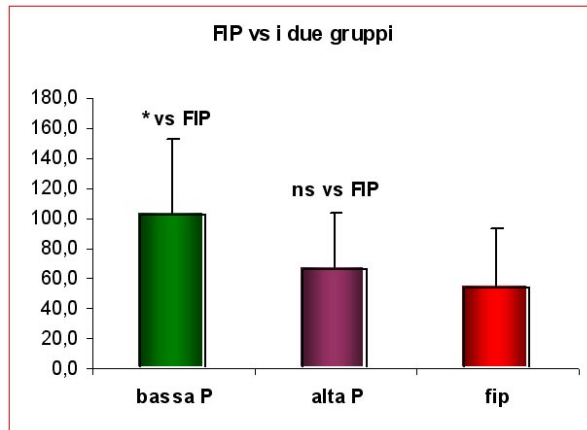


Figura 2. Concentrazione di interferone- γ . Confronto tra i diversi gruppi

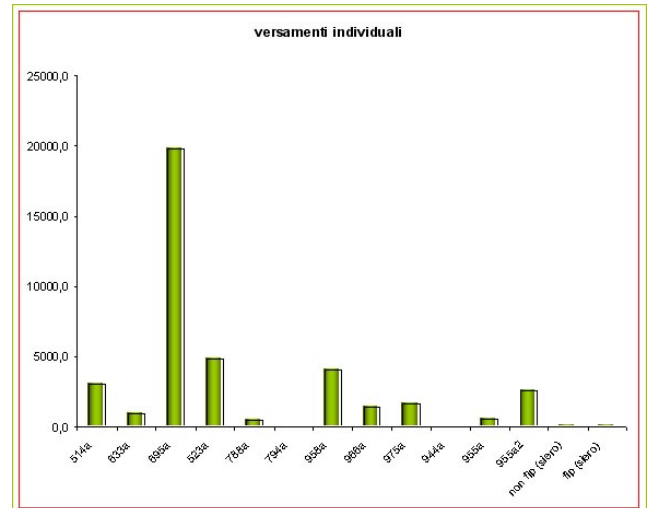


Figura 3. Concentrazione di interferone- γ . Confronto tra versamento e siero nei gatti malati

CORONAVIROSIS AND IMMUNITARY RESPONSE: PRELIMINARY RESULTS ON γ -INTERFERON SERUM CONCENTRATION IN SYMPTOMATIC AND NON-SYMPTOMATIC CATS

The possible role of interferon (IFN- γ) in the pathogenesis of Feline Infectious Peritonitis (FIP), induced by Feline Coronaviruses (FCoVs) is controversial: the expression of IFN- γ mRNA is downregulated in peripheral blood cells (PBL), but it is upregulated in tissues from cats with FIP. On the contrary, PBLs from non symptomatic, FCoV infected cats produce high levels of IFN- γ . It might thus be postulated that circulating IFN- γ protects FCoV affected cats from the disease. Nevertheless, no information on the actual level of circulating IFN- γ , which is the best indicator of functional IFN- γ production, are available. In the present study we used an ELISA specific for feline IFN- γ , to evaluate the amount of IFN- γ in serum from 8 clinically healthy, seropositive cats living in two catteries with different prevalence of FIP, and in serum and in effusions from 11 cats with FIP. Serum IFN- γ concentration were lower in cats with FIP ($54,5 \pm 38,0$ pg/ml), compared with those of non symptomatic cats living in catteries with low prevalence of FIP ($102,7 \pm 50,7$, $P < 0,05$), but not with those of cats living in catteries with high prevalence of FIP ($65,8 \pm 38,0$). This support the hypothesis of a protective role of circulating IFN- γ . The concentration of IFN- γ in the effusions had a high individual variability but was higher ($3279,1 \pm 5419,6$ $P < 0,001$) than that of the corresponding sera, suggesting a local IFN- γ production within the lesions.

Keywords: Feline Coronavirus (FCoV), Feline infectious peritonitis (FIP), gamma-interferon, ELISA, pathogenesis

LE NEOPLASIE CUTANEE DI ORIGINE EPITELIALE NEL CANE E NEL GATTO: CORRELAZIONI TRA DIAGNOSI CITOLOGICA ED ISTOLOGICA

Morini Maria., Papini Marco, Bettini Giuliano

Università di Bologna, Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale

È stato effettuato uno studio comparativo cito-istologico sulle neoplasie epiteliali cutanee del cane e del gatto, allo scopo di verificare l'attendibilità della diagnosi citologica nella differenziazione fra forme benigne e maligne e nel riconoscimento dell'esatto istotipo. In 24 casi (17 cani e 7 gatti) l'esame citologico è stato in grado di differenziare correttamente fra forme benigne e maligne, ed in alcuni casi è riuscito anche ad individuarne l'esatto istotipo (epitelioma sebaceo, carcinoma sebaceo e carcinoma squamocellulare). In altri casi (epitelioma intracutaneo corneificante, tumori follicolari, cisti) l'assenza di indicazioni sull'architettura tumorale ha permesso solamente una diagnosi citologica più generica.

Parole chiave: citologia, cute, tumori epiteliali cutanei, cane, gatto

INTRODUZIONE

L'attuale classificazione istologica dei tumori cutanei degli animali domestici proposta dall'Organizzazione Mondiale della Sanità per i tumori di derivazione epiteliale e melanocitaria (Goldschmidt et al., 1998) è molto accurata, ma estremamente articolata e complessa. In particolare i tumori epiteliali vengono classificati secondo un modello che prevede una suddivisione basata sul tipo e sulla presenza o meno di una differenziazione squamosa e/o annessiale. Tra le categorie principali ritroviamo quindi tumori senza differenziazione squamosa o annessiale (entro cui sono compresi i tumori a cellule basali), tumori dell'epidermide (che comprendono le neoplasie con differenziazione squamosa), tumori con differenziazione annessiale, cisti, amartomi e lesioni simil-tumorali, includendo in totale più di 40 diverse forme, cui ovviamente corrispondono giudizi prognostici molto diversificati.

Nella diagnostica citologica veterinaria le neoplasie cutanee sono state indagate in diversi studi (Rovetta et al., 1992; Ru et al., 1996; Militerno et al., 1999), con lo scopo principale di verificare l'accuratezza del metodo citologico nel discriminare correttamente fra le tre principali categorie istogenetiche (tumori epiteliali, mesenchimali ed a cellule rotonde), ma pochi studi si sono concentrati sulla possibilità della citologia di addivenire ad una diagnosi precisa delle neoplasie epiteliali (Masserdotti, 1998; Masserdotti ed Ubbiali, 2002).

In questo lavoro si è voluto pertanto verificare se e quanto, nell'ambito delle neoplasie epiteliali cutanee, la citologia agoaspirativa sia in grado, oltre a differenziare fra forme benigne e maligne, di avvicinarsi alla precisione della diagnosi istologica.

MATERIALI E METODI

Sono stati selezionati dall'archivio del Servizio di Anatomia Patologica del Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale dell'Università di Bologna un totale di 24 casi di neoformazioni cutanee (17 cani e 7 gatti) in cui, oltre al preparato citologico (proveniente da prelievi effettuati in vivo tramite agoaspirazione e colorati con May-Grunwald-Giemsa), era presente il corrispondente preparato istologico dal pezzo asportato chirurgicamente in tempi successivi, e la cui osservazione aveva dimostrato una neoplasia epiteliale.

La diagnosi citologica è stata successivamente confrontata con la diagnosi istologica, effettuata seguendo l'attuale classificazione proposta dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (Goldschmidt et al., 1998).

RISULTATI

L'osservazione istologica del materiale raccolto ha permesso di diagnosticare: 3 neoplasie cutanee di derivazione epidermica (tutti carcinomi squamocellulari ben

differenziati, 1 nel cane e 2 nel gatto, identificati correttamente dalla citologia);

4 neoplasie del follicolo pilifero (un epiteloma intracutaneo corneificante, un amartoma fibroannessiale, un tricolemmoma ed un pilomatricoma nel cane, diagnosticati tutti dalla citologia come neoplasie benigne di derivazione follicolare con produzione di cheratina, ed un tricoblastoma nel gatto, diagnosticato dalla citologia come neoplasia benigna a cellule basali);

7 neoplasie derivate dalle ghiandole sebacee (un amartoma sebaceo nel gatto ed un adenoma sebaceo nel cane, diagnosticati dalla citologia come proliferazioni benigne delle cellule sebacee; 4 epitelomi sebacei, 3 nel cane ed uno nel gatto, ed un carcinoma delle ghiandole sebacee nel gatto, tutti diagnosticati correttamente dalla citologia);

3 neoplasie di derivazione dalle ghiandole sudoripare (un adenocarcinoma dutturale apocrino nel gatto, in cui con la citologia era stato campionato solo materiale necrotico e due neoplasie miste delle ghiandole sudoripare nel cane, identificate correttamente dalla citologia);

1 carcinoma anaplastico di sospetta origine metastatica (mammella) nel cane.

5 forme cistiche diagnosticate con l'istologia come tre cisti infundibolari (identificate correttamente dalla citologia), una cisti panfollicolare e una cisti dermoide (diagnosticate dalla citologia come cisti non infundibolari), tutte nel cane.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Le neoplasie di derivazione epidermica con differenziazione squamosa sono state facilmente diagnosticate all'esame citologico, e presentavano un quadro pressoché sovrapponibile in tutti e tre i casi. La citologia ha infatti dimostrato la presenza di numerosissime cellule epiteliali con abbondante citoplasma di colore blu vitreo a diverse gradazioni di colore, caratteristiche del differente stadio di cheratinizzazione, ed evidenti atipie nucleari e nucleolari, che hanno permesso la diagnosi di carcinoma squamocellulare ben differenziato, confermata poi dal successivo esame istologico.

Fra le neoplasie cutanee di derivazione follicolare, la citologia è stata in grado di differenziare in tutti i casi fra tumori benigni e maligni, ma più difficilmente si è potuta avvicinare alla terminologia propria dell'istologia. Nell'epiteloma intracutaneo corneificante la citologia mostra piccoli e sporadici ammassi di cellule di derivazione epidermica, con differenziazione sia basale che squamosa, senza atipie cellulari, associata alla presenza di sporadici aggregati di cheratina matura. Quadro molto simile, e per questo motivo non differenziabile citologicamente dal precedente, lo manifestano sia il tricoepiteloma che il pilomatricoma. Nel tricoepiteloma, assieme a rari e piccoli ammassi di cellule ben differenziate di apparente derivazione basale, sono presenti anche numerose squame cornee di cheratina di tipo lamellare, disposte in aggregati od isolate sul fondo, tipiche delle neoplasie che derivano dalle porzioni più superficiali del follicolo pilifero (Masserdotti, 1998); nel pilomatricoma invece la cheratina è sotto forma di aggregati di materiale bluastro amorfo con occasionali "cellule fantasma" (squame cornee con centro citoplasmatico acromatico, sede dei processi di regressione del nucleo), tipiche della cheratinizzazione derivata dalla matrice del pelo, ed elemento chiave per il riconoscimento diagnostico del pilomatricoma nell'uomo (Domanski e Domanski, 1997) e nel cane (Masserdotti ed Ubbiali, 2002). I campioni citologici derivati dal tricoblastoma sono invece costituiti esclusivamente da ammassi irregolari di cellule di piccole dimensioni, scarso citoplasma e nucleo ovoidale, che permettono il riconoscimento della natura benigna e della derivazione basale, ma la cui origine poteva essere ugualmente imputata, oltre che alle cellule di rivestimento del follicolo pilifero, allo strato basale dell'epidermide (epiteloma a cellule basali/basalioma).

Più precisa è stata la concordanza terminologica tra citologia ed istologia nell'ambito delle neoplasie derivate dalle ghiandole sebacee, anche se in amartoma sebaceo, iperplasia ed adenoma sebaceo il quadro citologico mostra indistintamente piccoli ammassi di cellule a disposizione similghiandolare, senza evidenti atipie, con citoplasma voluminoso e costituito da

numerose e piccole vacuolizzazioni otticamente vuote, riconoscibili come cellule sebacee in proliferazione benigna. Caratteristico è invece l'aspetto citologico dell'epitelioma sebaceo, in cui è evidente la compresenza delle due componenti cellulari proliferate che costituiscono questa neoplasia, quella basale, numericamente preponderante e costituita da ammassi di piccole cellule basali benigne, e quella sebacea, con sebociti isolati e frammisti alle cellule basali. In tutti i casi presenti in questo studio la citologia ha permesso un adeguato riconoscimento diagnostico e quindi una adeguata concordanza anche nell'esatta individuazione dell'istotipo. Considerazioni analoghe sono state possibili anche nel caso del carcinoma sebaceo, in cui accanto al riconoscimento citologico della differenziazione sebacea delle cellule presenti in voluminosi aggregati, è stato possibile individuare la malignità della neoformazione dalla presenza di evidenti atipie nucleari e nucleolari delle cellule proliferate.

Anche per le neoplasie delle ghiandole sudoripare vi è una corrispondenza terminologica più precisa rispetto a quanto sia stato possibile per le neoplasie follicolari, e tutti i casi da noi raccolti hanno permesso di giungere ad una concordanza diagnostica citologica, fatta eccezione per un solo caso, in cui la presenza di ampie aree di necrosi nel contesto di un carcinoma ne ha compromesso il corretto riconoscimento.

Le cisti sono state diagnosticate dalla citologia come lesioni di tipo cistico contenenti cheratina, come tale visibile sul preparato come materiale amorfo bluastro, talora a margini irregolari ed a disposizione globulare, talora sotto forma di squame cornee poligonali, di dimensioni uniformi (tipo squamolaminare). Poiché quest'ultimo tipo di cheratina è caratteristico delle porzioni più superficiali del follicolo pilifero (infundibolo), e tre delle cinque cisti presenti nello studio possedevano nella loro totalità la presenza di materiale cheratinico riconducibile a questo tipo di cheratinizzazione, le cisti infundibolari sono state supposte come tali già dall'esame citologico. Per tutte le altre tipologie di cisti (istmiche, panfollicolari, dermoidi, apocrine, del dotto sebaceo, ciliate) che derivano dalle altre porzioni del follicolo quali l'istmo e/o il bulbo, con o senza proliferazione annessiale

concomitante, e che possiedono lo stesso tipo di cheratinizzazione di tipo amorfo e/o con cellule fantasma, la corretta distinzione si basa anche e soprattutto sulle caratteristiche istologiche della parete, e la citologia non può essere ovviamente in grado di effettuare un adeguato riconoscimento. Nel nostro studio, per le altre due cisti presenti (una cisti panfollicolare ed una cisti dermoide) è stata quindi possibile solamente una generica diagnosi citologica di lesione di tipo cistico non infundibolare.

I risultati ottenuti, pur nella limitatezza della casistica, confermano la buona capacità del metodo citologico nel discriminare fra neoplasie benigne e maligne. In alcuni casi (epitelioma sebaceo, carcinoma sebaceo e carcinoma squamocellulare) la citologia riesce ad individuare in modo efficace anche l'esatto istotipo, mentre in altre condizioni (epitelioma intracutaneo corneificante e neoplasie follicolari quali il tricoepitelioma, il tricolemmoma ed il pilomatrixoma) l'assenza di informazioni sull'architettura rende la diagnosi necessariamente più generica. Per ciò che concerne le cisti infine la citologia riesce bene a discriminare correttamente questa categoria diagnostica, ma per quanto riguarda il tipo di cisti è possibile solamente differenziare fra cisti infundibolare (peraltro le più frequenti) o cisti di derivazione non infundibolare, sulla base del tipo di cheratinizzazione presente sul preparato.

BIBLIOGRAFIA

1. Militerno G, Preziosi R, Bettini G (1999): "Lesioni cutanee nodulari del cane e del gatto. Diagnostica cito-istomorfologica comparativa". *Obiettivi & Documenti Veterinari* 22(12): 49-59.
2. Domanski HA, Domanski AM (1997): "Cytology of pilomatrixoma (calcifying epithelioma of Malherbe) in fine needle aspirates". *Acta Cytologica* 41: 771-777.
3. Goldschmidt MH, Dunstan RW, Standard AA, von Tscharner C, Walder EJ, Yager JA (1998): "Histologic classification of epithelial and melanocytic tumors of the skin of domestic animals". 2nd series, Vol III, AFIP-WHO, Washington, D.C.
4. Masserdotti C (1998): "Esame citologico dei tumori follicolari". *Quaderni di Dermatologia* 3: 21-24.

5. Masserdotti C, Ubbiali FA (2002): “Fine needle aspiration cytology of pilomatricoma in three dogs”. *Veterinary Pathology* 31: 22-25.
6. Rovetta G, Scanziani E, Caniatti M (1992): “Biopsia per aspirazione con ago sottile e biopsia con ago “Tru-Cut” nella diagnosi delle neoplasie cutanee”. *Veterinaria* 6: 75-78, 81-84.
7. Ru G, Canese MG, Bosticco C, Buracco P (1996): “Biopsia per aspirazione con ago sottile. Valutazione del metodo su 203 casi consecutivi”. *Selezione Veterinaria* 12: 991-1003.

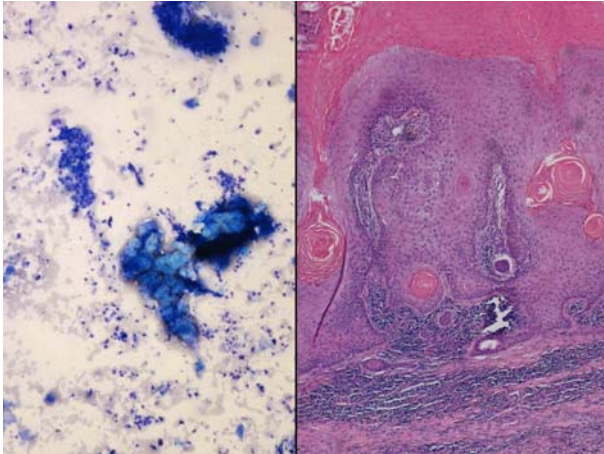


Figura 1. Cane, Setter, F, 5 anni, neof ormazione di circa un centimetro di diametro nel terzo caudale della coda, epiteloma intracutaneo cornificante. A sinistra: May-Grunwald-Giemsa, medio ingrandimento; a destra, ematossilina-eosina, piccolo ingrandimento.

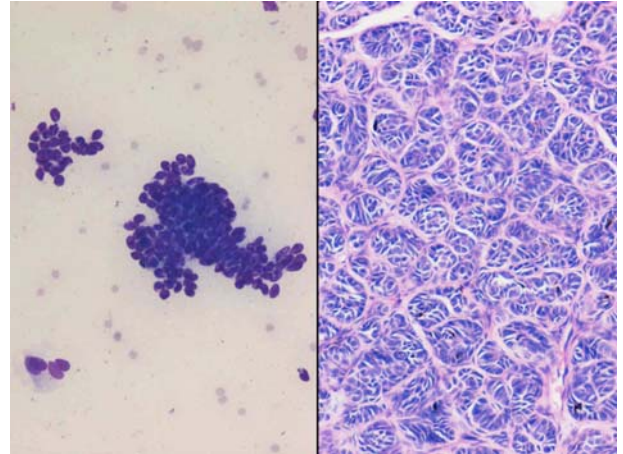


Figura 2. Gatto, Europeo, M, 17 anni, neof ormazione pedunculata nella regione del carpo destra, tricoblastoma di tipo trabecolare. A sinistra: May-Grunwald-Giemsa, forte ingrandimento; a destra: ematossilina-eosina, medio ingrandimento.

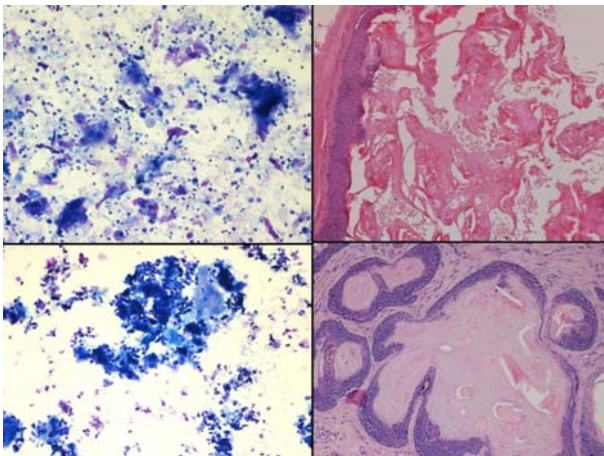


Figura 3. In alto: cane, Labrador, F, 6 anni, neof ormazione cutanea nel fianco destro, pilomatricoma. A sinistra: May-Grunwald-Giemsa, medio ingrandimento; a destra: ematossilina-eosina, piccolo ingrandimento. In basso: cane, Bovaro del Bernese, F, 3 anni, neof ormazione cutanea sulla testa, tricoepiteloma. A sinistra, May-Grunwald-Giemsa, medio ingrandimento; a destra, ematossilina-eosina, piccolo ingrandimento.

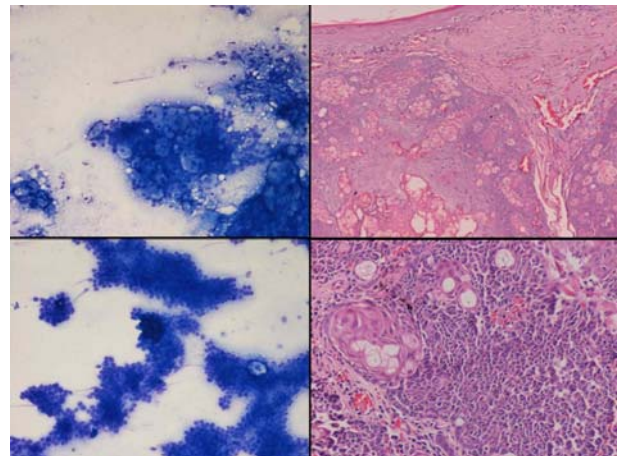


Figura 4. In alto: gatto, Certosino, M, 10 anni, neof ormazione ulcerata alla base della coda, epiteloma sebaceo. A sinistra: May-Grunwald-Giemsa, forte ingrandimento; a destra, ematossilina-eosina, piccolo ingrandimento. In basso: cane, Bassotto Tedesco, F, 10 anni, neof ormazione di 2 x 2 centimetri di diametro nel labbro superiore, epiteloma sebaceo. A sinistra: May-Grunwald-Giemsa, piccolo ingrandimento; a destra: ematossilina-eosina, medio ingrandimento.

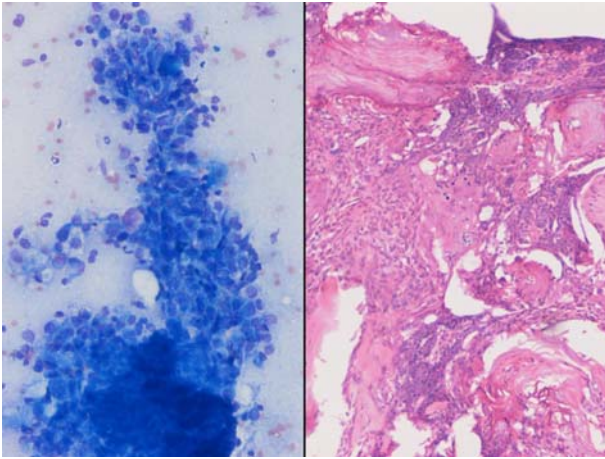


Figura 5. Cane, Meticcio, M, 10 anni, neof ormazione nel collo, 4 x 3 centimetri circa di diametro, adenocarcinoma apocrino complesso. A sinistra: May-Grunwald-Giemsa, forte ingrandimento; a destra, ematossilina-eosina, medio ingrandimento.

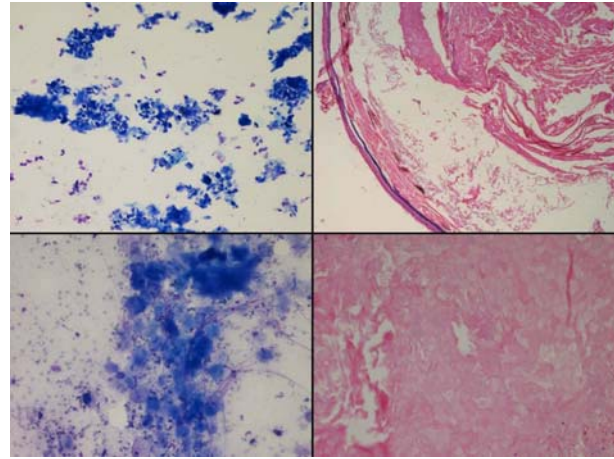


Figura 6. In alto: cane, Dobermann, M, 1 anno, neof ormazione nella regione della fronte, cisti infundibolare. A sinistra: May-Grunwald-Giemsa, piccolo ingrandimento; a destra: ematossilina-eosina, piccolo ingrandimento. In basso: cane, Pastore Tedesco, F, 3 anni, neof ormazione nella regione della groppa, cisti panfollicolare. A sinistra: May-Grunwald-Giemsa, medio ingrandimento; a destra: ematossilina-eosina, medio ingrandimento.

CANINE AND FELINE EPITHELIAL SKIN TUMORS: A COMPARATIVE ASSESSMENT BETWEEN CYTOLOGY AND HISTOLOGY

A comparative study between cytology and histology was carried out on canine and feline epithelial skin tumors to assess the reliability of fine-needle aspiration cytology in recognizing benignancy or malignancy and the exact histotype. In 24 cases (17 dogs and 7 cats) of epithelial cutaneous tumors the cytology has properly separated benign from malignant neoplasms, and in some cases has also correctly characterized the histotype (sebaceous epithelioma, sebaceous carcinoma and squamous cell carcinoma). In other cases the absence of architectural figures (intra-cutaneous cornifying epithelioma, follicular tumors and cysts) was responsible for the less specificity offered by the cytological diagnosis.

Keywords: cytology, skin, epithelial cutaneous tumors, dog, cat

ESPRESSIONE DELLA FOSFATASI ALCALINA PLACENTARE NEI SEMINOMI DEL CANE

Grieco Valeria, Riccardi Elena, Ciampi Valentina, Finazzi Mario

Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria – Sezione di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviaria – Facoltà di Medicina Veterinaria - Università degli Studi di Milano.

In medicina umana, tra i seminomi si distinguono il seminoma classico (SE) e il seminoma spermatocitico (SS). Il primo, sempre maligno, è tipico dei soggetti giovani. Il secondo colpisce gli anziani ed è caratterizzato da bassa malignità. Il SE deriva da gonociti, il cui sviluppo si è arrestato al periodo embrionario. Le cellule del SE, al pari dei gonociti embrionari, nella specie umana sono PAS+ e positive all'immunoistochimica per fosfatasi alcalina placentare (PALP). Il seminoma spermatocitico (SS), invece, deriva dagli spermatozoi, cellule seminali più differenziate. Le cellule del SS sono PAS e PALP negative. Per verificare se nel cane come nell'uomo esistano i due differenti tipi di seminoma, sezioni ottenute da 43 campioni diagnosticati come seminoma sono state colorate con PAS e con un anticorpo monoclonale anti-PALP. Venti campioni sono risultati positivi a PAS e PALP e sono stati considerati SE. 23 campioni PAS e PALP negativi, sono stati considerati SS. In base alle colorazioni effettuate e, soprattutto all'espressione di PALP, con il presente studio si dimostra che, come nell'uomo, nella specie canina sono presenti due differenti tipi di seminoma: quello classico e quello spermatocitico.

Parole chiave: cane, seminoma classico, seminoma spermatocitico, PALP

INTRODUZIONE

Il seminoma è una neoplasia comune sia nell'uomo che nel cane. Nell'uomo nella classificazione del WHO sono annoverati 2 tipi di seminoma, quello classico (SC) e quello spermatocitico (SS). Il SC è tipico dei soggetti giovani, è maligno e metastatizza facilmente. Il SS, al contrario, si sviluppa in soggetti anziani, mostra un comportamento biologico frequentemente benigno, tende ad espandersi localmente, metastatizzando solo in rarissimi casi (Mostofi e Sesterhenn, 1998). Pur trattandosi di due tumori dell'epitelio seminale la loro origine cellulare è alquanto diversa. Il SC deriva dai gonociti, cellule staminali dell'epitelio seminale che, per un alterato livello di estrogeni materni non sono evoluti a spermatozoi, cosa che normalmente accade entro il primo trimestre di gravidanza. Il SS si sviluppa invece da cellule più mature, gli spermatozoi, all'interno di un epitelio seminale normalmente conformato. Morfologicamente, il SC è costituito da grosse cellule da tonde a poligonali, dotate di un indice mitotico variabile ma generalmente basso. Il SS, al contrario, al pari dell'epitelio seminale normale, dal quale si sviluppa, possiede cellule

di diverse dimensioni e può mostrare indice mitotico piuttosto alto (Looijenga *et al.*, 1994; Mostofi e Sesterhenn, 1998). I due tumori sono distinguibili attraverso semplici colorazioni. Infatti, mentre il SC, come i gonociti, reagisce positivamente al PAS e all'immunoistochimica (IIC) per fosfatasi alcalina placentare (PALP) il SS è, al contrario, negativo per entrambe le colorazioni (Masson, 1946; Cummings *et al.*, 1994; Mostofi e Sesterhenn, 1998).

Relativamente alla specie canina, nella classificazione del WHO è descritto il seminoma ma non è riportata una ulteriore classificazione in SC ed SS (Kennedy *et al.*, 1998). D'altro canto, il fatto che nel cane il seminoma si sviluppa in soggetti anziani, con basso grado di malignità e rara metastatizzazione (Dow, 1962), ha fatto supporre che i seminomi canini od una parte di essi siano da assimilare al SS umano. Fino ad oggi sono stati pubblicati diversi lavori in materia (Mc Donald *et al.*, 1938; De Vico *et al.*, 1994; Looijenga *et al.*, 1994; Maiolino *et al.*, 2004) ma la chiara presenza di SS, nel cane, non è ancora stata accertata.

MATERIALI E METODI

Al fine di verificare l'esistenza del SS nella specie canina, sono stati prelevati a random dall'archivio della nostra Sezione i blocchetti in paraffina, e le relative sezioni colorate con Ematossilina Eosina (EE), di 50 seminomi, fissati in formalina e processati secondo le normali pratiche di routine istopatologica. I tumori provenivano da cani di età compresa tra i 7 e i 14 anni.

Per ciascuno di tali blocchetti sono state ottenute 2 sezioni seriate di 5 micron di spessore, una da colorare con PAS e l'altra da sottoporre ad IIC (ABC) impiegando, quale anticorpo primario un monoclonale DAKO anti-PALP umana (diluizione 1:25). In ogni prova di IIC è stata inserita una sezione di placenta canina come controllo positivo. Inoltre, visto che la PALP marca, oltre ai gonociti anche la muscolatura dei vasi e le cellule mioidi collocate alla periferia dei tubuli seminali, sono stati considerati valutabili solo quei tumori nelle cui sezioni tali controlli interni avessero reagito positivamente.

Sulle sezioni colorate con EE si è proceduto anche alla conta dell'indice mitotico (IM), valutando le mitosi presenti in 10 campi a 400X e poi calcolando il valore medio.

RISULTATI

In base alla reazione positiva dei controlli interni sopra menzionata, 43 dei 50 tumori selezionati sono risultati valutabili. I rimanenti 7, i cui controlli interni avevano dato esito negativo, sono stati, per contro, eliminati dalla casistica.

In base alla colorazione con PAS, 20 dei 43 tumori esaminabili sono risultati PAS positivi e, pertanto, classificati come SC (Fig.1). I restanti 23 tumori, negativi per PAS, sono invece stati considerati SS. Morfologicamente i due gruppi di tumori mostravano alcune differenze. I tumori classificati come SC erano formati da cellule monomorfe, da tonde a poligonali, con diametro 20-30 micron, ampio citoplasma e grande nucleo vescicoloso recante, sempre, un voluminoso ed evidente nucleolo. Nei seminomi classificati come spermatocitici, invece, era presente un discreto polimorfismo cellulare e, soprattutto una elevata polidimensionalità. Infatti accanto a

cellule piccole (15 micron), vi erano elementi di dimensione variabile che potevano raggiungere anche i 50 micron. I nuclei erano meno voluminosi, la cromatina granulare ed i nucleoli spesso multipli (2-4).

Anche i valori relativi all'IM erano diversi. Infatti mentre nei SC la maggior parte dei tumori mostrava indice mitotico tra 0 e 1,5, arrivando in rari casi a 2,5-3, nei SS era presente una maggiore variabilità e numerosi casi mostravano IM compreso tra 3 e 6.

Quanto ai risultati relativi all'IIC, le 20 neoplasie PAS + hanno tutte reagito positivamente alla PALP, dimostrando la loro reale appartenenza ai seminomi classici. Il segnale di positività per PALP era evidenziabile o a carico di tutto il citoplasma (Fig.2) o a livello della membrana delle cellule neoplastiche (Fig.3). Le 23 neoplasie PAS negative sono risultate pure negative alla PALP e, pertanto, a maggior ragione considerate seminomi spermatocitici.

DISCUSSIONE

Attraverso le medesime colorazioni impiegate in medicina umana, si dimostra che nel cane come nell'uomo sono presenti i due tipi di seminoma, vale a dire la forma classica e quella spermatocitica. Le analogie con le forme umane sembrano essere notevoli. Infatti il SC canino mostra, come già descritto per quello umano, grandi cellule monomorfe, dotate di IM piuttosto basso. Situazioni diversa si verifica nel SS canino che, come la forma umana, mostra notevole polidimensionalità cellulare ed un IM decisamente più alto rispetto alla forma classica.

L'unico dato che sembra divergere nella comparazione dei seminomi canini con quelli umani è quello relativo all'età di insorgenza delle neoplasie. Infatti i cani da noi esaminati presentavano tutti un'età elevata, non inferiore ai 7 anni, mentre, come già detto nell'uomo il SC è tipico dei soggetti giovani. Ulteriori studi sono necessari per stabilire se le due forme, nel cane, siano dotate di una prognosi diversa come nell'uomo.

CONCLUSIONI

- Viene dimostrata la presenza di due forme di seminoma nel cane.

- In accordo con le ipotesi formulate da altri autori, il SS sembra ben rappresentato. Infatti, più della metà dei casi da noi esaminati era da far risalire a tale forma neoplastica.
- Al contrario dell'uomo, dove il SC si sviluppa nei giovani e quello spermatocitico negli anziani, nel cane il seminoma in generale sembra svilupparsi in soggetti di età avanzata.

BIBLIOGRAFIA

1. Cummings O.W., Ulbright T.M., Eble J.N., Roth, L.M. (1994). Spermatocytic seminoma: an immunohistochemical study. *Human Pathology*, **25**, 54-59.
2. De Vico G., Papparella S., Di Guardo G. (1994). Number and size of silver-stained nucleoli (Ag-NOR) clusters) in canine seminomas: correlation with histological features and tumour behaviour. *Journal of Comparative Pathology*, **100**, 267-273.
3. Dow C. (1962). Testicular tumours in the dog. *Journal of Comparative Pathology*, **72**, 247-265.
4. Hustin J., Gillerot Y., Collette J., Franchimont P. (1990). Placental alkaline phosphatase in developing normal and abnormal gonads and in germ-cells tumours. *Virchow Archiv A Pathological Anatomy and Histopathology*, **417**, 67-72.
5. Kennedy P.C., Cullen J.M., Edwards J.F., Goldschmidt M.H., Larsen S., Munson L., Nielsen, S. (1998). Histological classifications of tumors of the genital system of domestic animals. In: World Health Organisation International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals. Second series, volume IV, 17-18. Ed. By the Armed Forces Institute of Pathology, Washington D.C. (USA).
6. Looijenga L.H.J., Olie R.A., Van der Gaag I., Van Sluijs F.J., Matoska J., Ploem-Zaaijer J., Kneplé C., Oosterhuis J.W. (1994). Seminoma of the canine testis. Counterpart of spermatocytic seminoma of men ?. *Laboratory Investigation*, **74**, 490-496.
7. Maiolino P., Restucci B., Papparella S., Paciello O., De Vico G. (2004). Correlation of nuclear morphometric features with animal and human World Health Organization international histological classifications of canine spontaneous seminomas. *Veterinary Pathology*, **41**, 608-611.
8. Masson P. (1946). Études sur le séminome. *Révue Canadienne de Biologie*, **5**, 361-387.
9. McDonald J.R., Schlotthauer C.F., Bollman J.L. (1938). The pathogenesis of seminoma of the testis. A histologic study in dog. *Surgery*, **3**, 904-911.
10. Mostofi F.K., Sesterhenn, I.A. (1998). Histological typing of testis tumors. In: World Health Organisation International Histological Classification of Tumors, Second edition, World Health Organisation, Geneva.

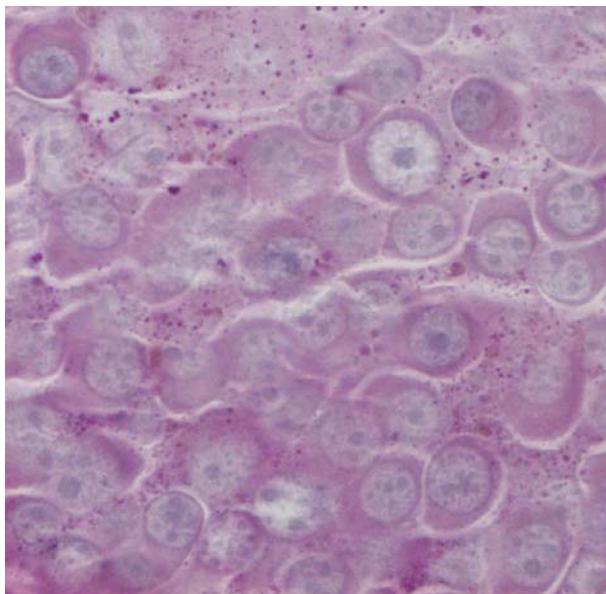


Figura 1. Cane, seminoma classico diffuso. Colorazione PAS. Si noti la PAS positività delle cellule neoplastiche. 400X

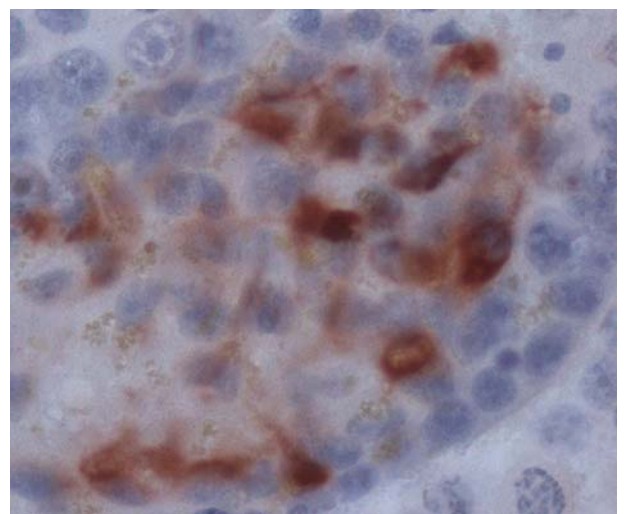


Figura 2. Cane, seminoma classico intratubulare. Immunoistochimica per PALP. Si noti la positività citoplasmatica delle cellule neoplastiche. 400X

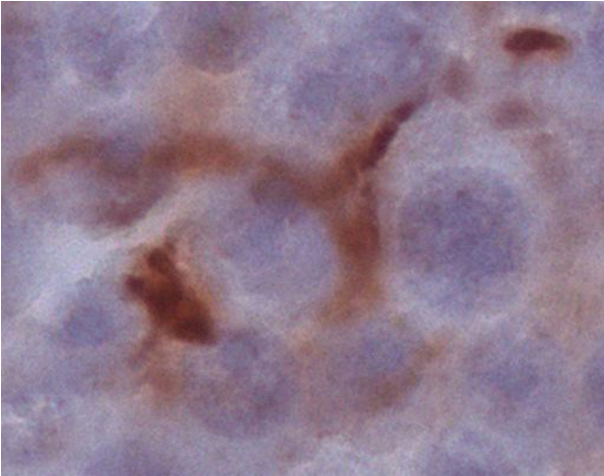


Figura 3. Cane seminoma classico diffuso. Immunohistochimica per PALP. Si noti la positività di membrana delle cellule neoplastiche. 600X

ALKALINE PHOSPHATASE EXPRESSION IN CANINE SEMINOMAS

Seminoma (SE) is frequent in human as in canine species. While in human seminomas are malignant and typical of young subjects, the canine counterpart shows low metastatic potential and affect old dogs. SE derives from undifferentiated gonocytes arrested during embryonic development. SE cells are PAS+ and immunohistochemically + for placental alkaline phosphatase (PALP). In human species, a less malignant tumor arising from spermatocytes, PAS and PALP negative, called spermatocytic seminoma (SS), is reported in old men. Section from 43 formalin fixed and paraffin embedded canine seminomas were obtained and stained with EE, PAS and immunohistochemically tested for PALP to determine if they were SE or SS. Twenty samples, both PAS and PALP positive were considered SE. Twenty-three samples both PAS and PALP negative were diagnosed as SS. This report demonstrated that in canine species, as in human beings, two different types of seminoma are present: classic and spermatocytic.

Keywords: dog, classic seminoma, spermatocytic seminoma, PALP

APPROCCIO IMMUNOISTOCHEMICO NELLA DIAGNOSI DEI TUMORI DELLE CELLULE DELLA GRANULOSA DEL CANE

Riccardi Elena, Grieco Valeria, Verganti Sara, Finazzi Mario

DiPAV, Sezione di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviare, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Milano

In patologia umana, gli studi immunohistochimici sull'espressione di citocheratina (CK), vimentina (VIM) ed inibina (INH) nell'ovaio normale e nei tumori ovarici sono numerosi. In veterinaria, analoghi dati relativi alla specie canina, sono scarsi o addirittura assenti. Nel cane, come nell'uomo, i tumori delle cellule della granulosa (TCG) sono relativamente poco frequenti ma pongono spesso problemi di diagnosi differenziale verso i carcinomi ovarici. Lo scopo di questo lavoro è studiare l'espressione di CK, VIM ed INH nell'ovaio normale di cane ai fini di stabilire un "panel" anticorpale da applicare alla diagnosi differenziale dei tumori ovarici. Da 4 ovaie normali e da 11 neoplasie diagnosticate come TCG fissate in formalina e incluse in paraffina sono state ottenute sezioni colorate con ematossilina-eosina e con metodica immunohistochimica per l'espressione di CKAE1/AE3, CK7, VIM ed INH. Nelle ovaie normali CK7 marcava la componente epiteliale. Nelle cellule della granulosa (CG), CK7 negative, la positività per CKAE1/AE3, VIM ed INH diminuiva con la progressiva maturazione del follicolo. 9/11 neoplasie, negative per CK7, mostravano, anche nella stessa neoplasia, positività variabile per CKAE1/AE3, VIM ed INH. 2/11 delle neoplasie esaminate erano negative per INH e positive per CK7. Le CG normali hanno un profilo immunohistochimico che varia a seconda dello stadio di maturazione. Le variazioni di espressione di VIM, CK ed INH riscontrate nei TCG rispecchiano questa particolarità e sono verosimilmente da ricondursi allo stadio di sviluppo follicolare da cui hanno avuto origine. Sulla base della positività per CK7 e della totale negatività per INH, 2 degli 11 campioni esaminati sono stati definitivamente diagnosticati come neoplasie di origine epiteliale.

Parole chiave: cane, ovaio, immunohistochimica, cellule della granulosa

INTRODUZIONE

I tumori delle cellule della granulosa (TCG) sono neoplasie ovariche poco frequenti, sia nell'uomo che nel cane (5, 10), presentano comportamento biologico generalmente benigno, non tendendo a metastatizzare ma, piuttosto, ad espandersi localmente (10). I TCG mostrano quadri istologici estremamente variabili, tanto che la diagnosi differenziale tra essi e le neoplasie ovariche di origine epiteliale è spesso difficile (9,12). Tale distinzione risulta, però, estremamente importante in quanto, al contrario dei TCG, i tumori di origine epiteliale sono spesso maligni, metastatizzando frequentemente ed avendo, pertanto, prognosi infausta (10). Per giungere ad una accurata distinzione tra i due tipi di tumore, in medicina umana sono stati pubblicati numerosi studi di immunohistochimica (IIC) impiegando anticorpi diversi. Tra questi, importanti sono quelli diretti contro le citocheratine (CK) e la vimentina (VIM), la cui espressione è stata

studiata sia nell'ovaio normale, che in TCG e carcinomi ovarici (11). In particolare la CK7, espressa in condizioni normali dall'epitelio superficiale dell'ovaio, ha dimostrato di riconoscere in modo selettivo i carcinomi ovarici (1). Per il riconoscimento specifico delle cellule della granulosa (CG) sembra, invece, più importante la VIM. Un altro marker recentemente impiegato in medicina umana per il riconoscimento specifico delle CG è l'inibina alfa (INH α), ormone peptidico sintetizzato proprio da tali cellule (2), la cui funzione principale è quella di inibire il rilascio ipofisario dell'ormone follicolo-stimolante (FSH) (6).

In medicina veterinaria, i lavori pubblicati riportano che gli aspetti istologici dei TCG nel cane sono estremamente variabili (5). Per contro, gli studi di IIC che hanno avuto per oggetto tali tumori sono limitati e focalizzati soprattutto sull'espressione dell'INH α (7, 8). Lo scopo di questo lavoro è, pertanto, quello di studiare l'espressione di CK, VIM ed INH α nelle CG dell'ovaio normale e in TCG di cane

ai fini di stabilire un “panel” anticorpale da applicare alla diagnosi differenziale dei tumori ovarici.

MATERIALI E METODI

Da 4 ovaie normali e da 11 neoplasie ovariche precedentemente diagnosticate come TCG, provenienti dall’archivio della nostra Sezione, fissate in formalina e incluse in paraffina, sono state ottenute sezioni colorate con ematossilina-eosina (EE). Per ogni neoplasia erano disponibili da 2 a 4 blocchetti in paraffina. Da ogni blocchetto di ciascun tumore sono state poi ottenute altre sezioni da destinare all’ IIC. L’elenco degli anticorpi primari impiegati, le relative diluizioni e le tecniche di smascheramento antigenico sono riportati nella Fig. 1.

RISULTATI

Esame istologico

Nelle 4 ovaie normali esaminate erano evidenti follicoli a diversi stadi di maturazione.

Le 11 neoplasie esaminate presentavano quadri morfologici variabili, spesso anche all’interno della stessa neoplasia, del tipo macro e/o microfollicolare, trabecolare, sarcomatoide e solido. Inoltre, è stata notata la presenza di aree a differenziazione simil-sertoliforme.

IIC. Ovaio normale

CKAE1/AE3: le CG erano sempre positive in tutti gli stadi di sviluppo dei follicoli. Tuttavia, nel follicolo antrale, l’intensità del segnale diminuiva.

VIM: le CG del follicolo primordiale non esprimevano VIM. L’espressione di VIM era presente a partire dallo stadio di follicolo primario e si manteneva per tutti gli stadi di sviluppo.

INH α : le CG del follicolo primordiale non esprimevano INH α . L’espressione di INH α era presente a partire dallo stadio di follicolo primario e andava diminuendo negli stadi successivi. Nel follicolo antrale, la positività era localizzata solo a livello della corona radiata.

CK7: le CG in tutti gli stadi di sviluppo del follicolo erano sempre e costantemente negative. La positività per CK7 era presente

solo a livello dell’epitelio superficiale dell’ovaio.

IIC. TGC.

11/11 neoplasie esaminate sono risultate positive per CKAE1/AE3 (Fig. 2). La positività per questo marker era diffusa ma spesso di intensità variabile.

9/11 neoplasie esaminate sono risultate positive per VIM (Fig. 3). La positività poteva essere diffusa nell’intera neoplasia oppure poteva avere una distribuzione multifocale. Si potevano, inoltre, notare differenze nell’intensità del segnale anche all’interno della stessa neoplasia.

9/11 neoplasie esaminate sono risultate positive per INH α (Fig. 4). La percentuale di cellule positive variava da un minimo di 5% ad un massimo di 70%. Spesso, anche in ampie porzioni della neoplasia, la positività era limitata solo a gruppi di cellule.

Le due neoplasie risultate negative per VIM ed INH α e positive per CKAE1/AE3, sono state le uniche ad aver reagito positivamente per CK7 (Fig. 5).

DISCUSSIONE

Le CG nell’ovaio normale sono positive sia alla CKAE1/AE3 che alla VIM. Tale co-espressione è, molto probabilmente, da far risalire alla loro origine dall’epitelio del mesonefro embrionale il quale, pure, co-esprime tali filamenti intermedi (4).

Sempre nell’ovaio normale, il nostro studio ha messo in evidenza, come descritto nell’uomo, una diminuzione della positività alla CKAE1/AE3 con il procedere della maturazione del follicolo cui si contrappone una positività alla VIM pressoché costante (11). L’espressione di INH α è risultata specifica per le sole CG ed era presente in tutti gli stadi di sviluppo dei follicoli. Tuttavia, anche INH α mostra una diminuzione del numero di cellule positive con il procedere della maturazione del follicolo. Le CG sono invece risultate sempre negative per CK7, che, invece, ha marcato sempre e selettivamente l’epitelio ovarico superficiale, confermandosi un buon marker per il riconoscimento di tale comparto cellulare (3).

Venendo ai TCG esaminati, essi hanno mostrato aspetti istologici variabili, anche

all'interno della stessa neoplasia. Tuttavia non si è notata alcuna correlazione tra il quadro morfologico e l'espressione immunohistochimica di CK AE1/AE3, VIM ed INH. Inoltre, pur risultando positivi a questi 3 markers, la positività variava di intensità e di estensione sia nelle diverse neoplasie, sia da zona a zona in una stessa neoplasia. Questo dato, sulla base di quanto evidenziato nelle CG dell'ovaio normale, è verosimilmente da ricondursi allo stadio di sviluppo follicolare da cui hanno avuto origine le diverse neoplasie o al diverso stadio di sviluppo in cui si trovano le cellule neoplastiche all'interno di una stessa neoplasia. Pertanto, dato che i TCG sono spesso voluminosi ed a fronte della variabilità morfologica ed immunohistochimica riscontrata, ci sembra opportuno consigliare il campionamento di più pezzi della neoplasia nonché l'utilizzo di un "panel" anticorpale comprendente più markers e, in particolare, almeno INH α e CK7. Infatti, grazie alla positività per tale CK7 ed alla negatività per INH α , due neoplasie della nostra casistica, diagnosticate in passato come TCG su base esclusivamente morfologica, sono state invece definitivamente riconosciute come tumori originanti dall'epitelio ovarico superficiale.

BIBLIOGRAFIA

- Cathro HP, Stoler MH: Expression of cytokeratin 7 and 20 in ovarian neoplasia. *American Journal of Clinical Pathology* 117: 944-951, 2002.
- De Kretser DM, Robertson DM: The isolation and physiology of inhibin and related proteins. *Biology of Reproduction* 40: 33-47, 1989.
- Espinosa De Los Monteros A, Fernandez A, Millan MY, Rodriguez F, Herraez P, Martin De Las Mulas J: Coordinate expression of cytokeratins 7 and 20 in feline and canine carcinomas. *Veterinary Pathology* 36: 179-190, 1999.
- Frojdman K, Paranko J, Virtanen I, Pelliniemi LJ: Intermediate filament proteins and epithelial differentiation in embryonic ovary of the rat. *Differentiation*, 55: 47-55, 1993.
- Kennedy PC, Cullen JM, Edwards JF, Goldschmidt MH, Larsen S, Munson L, Nielsen S: *Histological classification of tumors of the genital system of domestic animals. WHO. 2nd series, Vol. IV, 1998.*
- Luisi S, Florio P, Reis FM, Petraglia F: Inhibin in female and male reproductive physiology: role in gametogenesis, conception, implantation and early pregnancy. *Human reproduction update* 2: 123-135, 2005.
- Marino G, Nicotina PA, Catone G, Contempo RA, Zanghi A: Alpha-Inhibin expression in canine ovarian neoplasms: preliminary results. *Veterinary research communications* 27: 237-240, 2003.
- Marino G, Zanghi A, Catone G, Bontempo RA, Nicotina PA: Expression of Inhibin/Activin α , β A and β B subunits in the ovary of the bitch. *Veterinary research communications* 27: 611-614, 2003.
- Scully RE: Sex cord-mesenchyme tumours: pathologic classification and its relation to prognosis and treatment. In: *Ovarian Cancer*, ed. by Gentil F and Junqueira AC, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, 1968.
- Scully R.E., Young, R.H. and Clement, P.B. Tumors of the ovary, maldeveloped gonads, fallopian tube and broad ligament. *Atlas of Tumour Pathology. 3rd series, fasc. 23.* Washington, DC: Armed Force Institute of Pathology, 1998.
- Van Niekerk CC, OC, Ramaekers FCS, Hanselaar AGJM, Aldeweireldt J, Poels LG. Changes in expression of differentiation markers between normal ovarian cells and derived tumors. *Am J Pathol*, 142: 157-177, 1993.
- Young RH, Scully RE: Ovarian sex cord-stromal tumors. *Problems in differential diagnosis. Pathol Annu* 23: 237-296, 1988.

Marker	Unmasking	Diluizione (1 in)
CKAE1/AE3	P	1 in 3 000
CK7	P	1 in 200
VIM	-	1 in 1 000
INH α	MW	1 in 50

Figura 1. Anticorpi monoclonali utilizzati per IIC con le rispettive diluizioni e metodi di smascheramento applicati. P: pepsina (termostato a 37° per 12 minuti). MW: microonde (750W per 8 minuti in tampone citrato pH6)

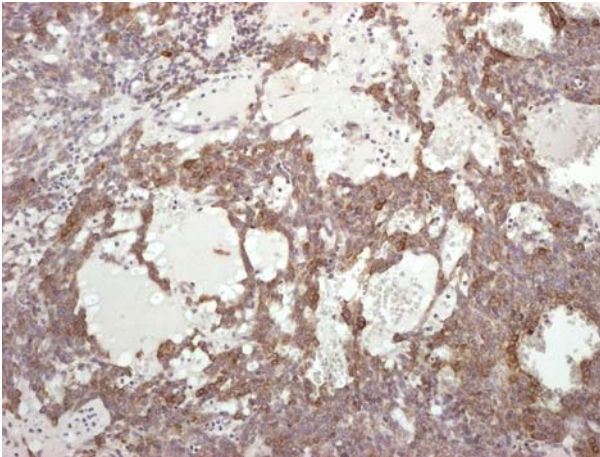


Figura 2. Cane, TCG. Tipo di crescita macrofollicolare. IIC per CKAE1/AE3. 200X.

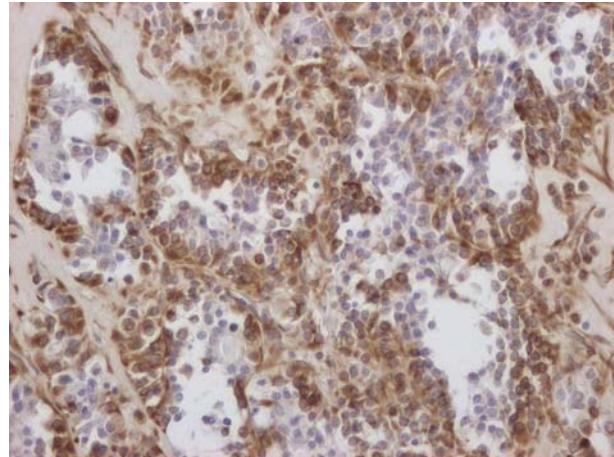


Figura 3. Cane, TCG. Aree con differenziazione simil-seminoliforme. IIC per VIM. 400X.

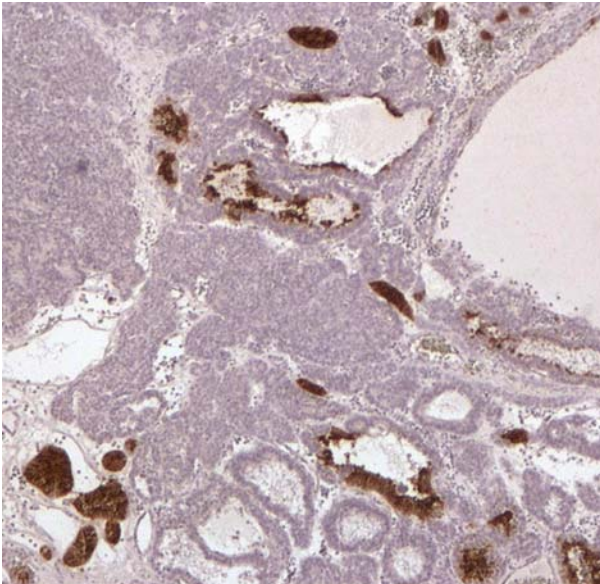


Figura 4. Cane, TCG. Tipo di crescita misto (solido e macrofollicolare). IIC per INH. 40X.

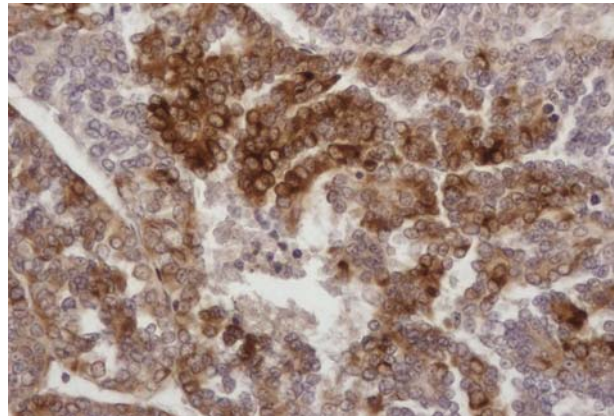


Figura 5. Cane. Adenocarcinoma ovarico. IIC per CK7. 400X.

CANINE GRANULOSA CELL TUMORS: AN IMMUNOHISTOCHEMICAL APPROACH

In human and canine species, the morphology of granulosa cell tumors (GCT) is variable and cause diagnostic difficulties. In human pathology, immunohistochemistry has been widely employed in the diagnosis of GCT. Limited studies on the immunophenotype of granulosa cells and related tumors are present in canine species. The aim of this study is to investigate the expression of cytokeratin (CK), vimentin (VIM) and inhibin (INH) in canine normal ovaries and GCT to establish an immunohistochemical approach in the diagnosis of ovarian tumors. From formalin fixed and paraffin embedded 4 normal ovaries and 11 GCT, sections were obtained and stained with haematoxylin and eosin and immunohistochemically for CKAE1/AE3, CK7, VIM and INH. In normal ovaries, CK7 was expressed in the epithelium. Granulosa cells (GC) expressed VIM, CK AE1/AE3 and INH and were negative for CK7. A decrease in expression of VIM, CKAE1/AE3 and INH was observed toward maturation of GC in Graffian follicles. VIM, CKAE1/AE3 and INH displayed different patterns of expression both within and between GCT. Only 2 GCT were CK7 positive and completely negative for INH. These latter were finally diagnosed as epithelial tumors. The pattern of expression of VIM, CKAE1/AE3 and INH in GCT may reflects the findings in their non-neoplastic counterpart.

Keywords: dog, ovary, immunohistochemistry, granulosa cells

EMANGIOSARCOMA DELLA III PALPEBRA IN UN CAVALLO

Ricci Giovanni, Lepri Elvio, Sforza Monica, Gialletti Rodolfo^o, Mechelli Luca

Dipartimento di Scienze Biopatologiche ed Igiene delle Produzioni Animali e Alimentari – Università degli Studi di Perugia – Italy. ^oDipartimento di Patologia, Diagnostica e Clinica Veterinaria - Università degli Studi di Perugia - Italy

Le neoplasie degli annessi oculari nel cavallo risultano ben documentate in letteratura ed in particolare per quanto concerne i carcinomi squamosi e sarcoidi, mentre risultano piuttosto rare quelle che originano da strutture vascolari.

La nostra indagine si riferisce ad un cavallo da sella belga, castrone di 17 anni con segni di lacrimazione e scolo nasale sieroemorragico monolaterale che tendeva a peggiorare con l'esposizione diretta alla luce solare. Alla visita si rilevava una evidente tumefazione della terza palpebra con essudazione emorragica superficiale. A motivo dei segni evidenziati, si decideva per la rimozione chirurgica della neoplasia.

Nei preparati istologici colorati con ematossilina-eosina, tricromica di Masson e aldeide fucsina si evidenziava un epitelio di rivestimento parzialmente ulcerato e caratterizzato da fenomeni di iperplasia e displasia. In sede subepiteliale si evidenziava un tessuto neoformato costituito da spazi vascolari ematici rivestiti da un endotelio atipico sorretto da abbondante stroma connettivale. Nelle aree più profonde la neoformazione risultava costituita da ammassi disseminati e compatti di cellule poligonali-fusate con più evidenti atipie citomorfologiche e numerose figure mitotiche. Era presente, inoltre, un diffuso infiltrato linfomonocitario ed una modica iperplasia del tessuto linfoide follicolare. Le indagini immunohistochemiche condotte con un panel di anticorpi (pancitocheratina, vimentina, Fattore VIII-RAg, Ki67, laminina, MMP-2, MMP-9) consentivano di confermare l'origine vascolare della neoplasia e di apprezzarne i caratteri di proliferazione e invasività. In particolare, entrambe le popolazioni cellulari risultavano intensamente positive al Fattore VIII-RAg.

Per gli aspetti morfologici ed immunohistochemici è stato possibile riferire la neoformazione ad un emangiosarcoma della terza palpebra. I dati anamnestici ed alcuni aspetti istomorfologici potrebbero suggerire l'ipotesi di una induzione attinica della neoplasia.

Parole chiave: equino, terza palpebra, emangiosarcoma

HEMANGIOSARCOMA OF THE THIRD EYELID IN A HORSE

In horses there are few reports of ocular and adnexal neoplasms. Squamous cell carcinoma and equine sarcoid are most commonly reported, while malignant vascular tumors are rare. A 17 years-old gelding was presented with an history of monolateral sero-hemorrhagic nasal and ocular discharge worsening after exposure to the sun. The third eyelid was diffusely thickened and hyperemic; therefore it was surgically removed.

Histologic examination revealed a neoplasm characterized by a superficial, more differentiated subepithelial vascular spaces lined by plumped endothelium with minimal atypia, supported by a thick collagenous stroma; in deeper area the neoplasm show a less differentiated solid sarcomatous pattern, multifocally disseminated and made of polygonal to spindle cells with marked atypia and high mitotic index. Immunohistochemistry (pancytocheratin, vimentin, Factor VIII-RAg, laminin, MMP-2 and MMP-9) confirmed the vascular origin of the tumor and allowed evaluation of proliferative and infiltrative behaviour. Hemangiosarcoma of third eyelid was diagnosed on histomorphology and immunoreactivity.

Some anamnestic and histopathological features could suggest actinic involvement in the pathogenesis of the neoplasia.

Keywords: horse, third eyelid, hemangiosarcoma

CISTI BILIARI MULTIPLE IN UN FEGATO DI LEONE (*Panthera leo*)

Bettini Giuliano⁽¹⁾, Pascotto Ernesto⁽²⁾, Guadagini Davide⁽³⁾

¹Università di Bologna, Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale.

²Università di Udine, Sezione biologia e patologia animale, Dipartimento di Scienze Animali.

³Parco Natura Viva, Bussolengo (Verona)

Le malattie epatiche fibropolicistiche sono un gruppo eterogeneo di patologie congenite (complessi di Von Meyenburg, malattia policistica del fegato, fibrosi epatica congenita, malattia di Caroli) in cui l'anomalia principale è rappresentata da alterazioni strutturali dell'albero biliare. Il caso descritto riguarda un leone maschio di 15 anni con cisti epatobiliari multiple, deceduto per grave emoperitoneo causato dal copioso sanguinamento di varici spleniche. Il riscontro di cisti biliari multiple è segnalato come evento non raro in diverse specie animali e selvatiche, ed è generalmente descritto come rilievo occasionale, di nessuna importanza clinica, mentre nell'uomo è segnalata la possibilità che le cisti epatiche possano essere all'origine di ipertensione portale, ittero, ascite sanguinamento peritoneale ed aneurismi. Si sottolinea la necessità di monitorare adeguatamente la riproduzione degli animali selvatici in cattività, al fine di evitare che la consanguineità possa favorire l'insorgere di patologie geneticamente trasmesse.

Parole chiave: leone, cisti biliari, malattia epatica policistica, emoperitoneo

INTRODUZIONE

Le malattie epatiche fibropolicistiche sono un gruppo eterogeneo di patologie congenite in cui l'anomalia principale è rappresentata da alterazioni strutturali dell'albero biliare. Si tratta di lesioni spesso riscontrate solo accidentalmente durante esami radiografici o all'autopsia, o che possono rendersi manifeste con epatosplenomegalia ed ipertensione portale in assenza di disfunzione epatica, tipicamente nella tarda infanzia, ma anche nell'età adulta (1). La patologia umana classifica queste anomalie in quattro forme distinte (complessi di Von Meyenburg, malattia policistica del fegato, fibrosi epatica congenita, malattia di Caroli), sebbene sia piuttosto frequente trovare contemporaneamente caratteristiche relative a più di una lesione. I complessi di Von Meyenburg, definiti anche come "microamartomi dei dotti biliari", derivano da residui embrionali dei dotti biliari, e si presentano istologicamente come piccoli grappoli di dotti biliari leggermente dilatati immersi in uno stroma fibroso; generalmente privi di significato clinico, è stata segnalata la loro occasionale trasformazione in colangiocarcinomi. Nella malattia policistica del fegato si osservano cisti in numero variabile, da poche e sparse a molteplici e diffuse, spesso raggruppate, contenenti di

solito un liquido paglierino; istologicamente appaiono rivestite da un epitelio di tipo biliare cuboidale o appiattito, supportate da un esile stroma fibroso e distaccate dall'albero biliare. La fibrosi epatica congenita è caratterizzata da un marcato ispessimento fibroso degli spazi portal, nel cui ambito si rileva un'intensa proliferazione di dotti biliari; è spesso associata ad ipertensione portale e può talvolta evolvere in cirrosi epatica. Nella malattia di Caroli si ha una dilatazione cistica segmentaria dei dotti biliari maggiori; condizione molto rara in forma pura, è più spesso associata a fibrosi epatica congenita e displasia dei dotti biliari minori (sindrome di Caroli) (1-2). Ognuna di queste patologie mostra una certa associazione con la malattia policistica renale (ADPKD – Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease), tanto che le cisti epatiche sono considerate la più frequente manifestazione extrarenale di ADPKD. L'associazione tra le due condizioni non è tuttavia costante e probabilmente è provocata da mutazioni diverse: nei pazienti con sole cisti renali si rileva la mutazione del gene PKD1, che codifica per la proteina di membrana policistina 1, mentre nei pazienti con cisti epatiche e renali è solitamente associata la mutazione del gene PKD2, che codifica per la policistina 2, una proteina implicata nel trasporto intracellulare del calcio (1-2); nei

pazienti con sole cisti epatiche (PLD – Polycystic Liver Disease) è stata invece riscontrata la mutazione del gene PRKCSH che codifica per la proteina epatocistina (2-4).

DESCRIZIONE DEL CASO

Si descrive un caso di cisti epatobiliari multiple (PLD) associate a rottura della milza ed emoperitoneo in un leone (*Panthera leo*) maschio di circa 15 anni di età del peso 150 kg, stabulato in gabbia presso il Parco Natura Viva (Bussolengo, Verona), nato e sempre vissuto in cattività. Il soggetto, finora in apparentemente discrete condizioni generali, è spontaneamente deceduto dopo un breve periodo (tre giorni) di apatia ed anoressia (fig. 1). L'esame necroscopico, condotto in situ, rilevava un imponente emoperitoneo e la presenza di lesioni multifocali in fegato e milza. Le lesioni epatiche (fig. 2) erano caratterizzate da una voluminosa formazione rotondeggiante del diametro di 12 cm alla base dei lobi medio sinistro e quadrato del fegato, di colore rosso scuro ed irregolarmente multiloculata; formazioni simili di dimensioni inferiori (1-5 cm) erano sparse nel rimanente parenchima epatico, che presentava diffuso colore giallognolo con evidente disegno lobulare. Al taglio le neoformazioni rivelavano natura policistica e contenuto fluido di aspetto sieroemorragico. La milza, discretamente ingrossata, mostrava due lesioni superficiali rilevate ad andamento serpiginoso di 5 x 1 cm (fig. 3) di colore rosso scuro, ampiamente lacerate ed aderenti a coaguli ematici, evidentemente responsabili del sanguinamento peritoneale. L'esame macroscopico degli altri organi non evidenziava apparenti deviazioni dalla norma.

L'esame istologico è stato condotto su sezioni allestite a partire da campioni di tessuto fissati in formalina ed inclusi in paraffina e colorate con ematossilina eosina e tricromica di Masson. Le neoformazioni epatiche evidenziavano il carattere di strutture cistiche multiple di diametro variabile rivestite nella loro superficie interna da epitelio monostratificato da cubico ad appiattito riferibile ad epitelio biliare, circondate da un sottile strato di tessuto fibroso e contenenti materiale proteinaceo eosinofilo (fig. 4). Il

circostante parenchima epatico mostrava diffusa dissociazione delle filiere epatiche e frequenti aspetti di sofferenza epatocellulare (microvacuolizzazioni, necrosi centrolobulare, apoptosi di singoli epatociti) e lieve colostasi intraepatica (fig. 5). Le lesioni spleniche presentavano carattere di ematoma in organizzazione (fig. 6), mentre nella polpa si rilevavano diffusa congestione e plasmocitosi. L'esame istologico degli altri organi evidenziava la sola presenza nei reni di sparsi focolai di nefrite interstiziale cronica.

DISCUSSIONE

I rilevati necroscopici permettevano di attribuire il decesso a shock emorragico acuto da emoperitoneo in associazione a lesioni multifocali epatospleniche; sulla base di tali reperti i sospetti diagnostici avanzati erano di emangiosarcoma della milza con metastasi epatiche, oppure di ematomi della milza e neoplasia (o cisti biliari) del fegato. L'esame istologico permetteva di escludere la prima ipotesi e di avvalorare la seconda; in particolare le lesioni focali del fegato erano nel complesso ascrivibili ad un quadro di malattia epatica policistica (PLD), mentre le lesioni spleniche associate all'emoperitoneo apparivano secondarie, anche per l'aspetto macroscopico, alla rottura di ectasie varicose di vasi splenici.

La presenza di cisti biliari multiple è una condizione segnalata con una certa frequenza in diverse specie animali domestiche e selvatiche ed in particolare nei felidi (5-11), come lesione unica o spesso associata ad analoghe lesioni cistiche nei reni (PKD - Polycystic Kidney Disease). Il riscontro di cisti epatiche è descritto nella patologia animale come rilievo occasionale, per lo più post-mortem, di nessuna importanza clinica; la presenza di una sintomatologia è infatti di solito secondaria all'insufficienza renale conseguente alla progressiva dilatazione di cisti renali eventualmente concomitanti. Nell'uomo, invece, è segnalata la possibilità che le cisti epatiche possano andare incontro a rottura ed infezione ed essere all'origine di fatti compressivi responsabili di ipertensione portale, ittero ed ascite; inoltre sono stati descritti diversi casi di sanguinamento

peritoneale, ectasie varicose dei vasi mesenterici ed aneurismi cerebrali, che suggeriscono la possibile presenza nei pazienti con PLD di una debolezza vascolare intrinseca (12-13). Le lesioni spleniche all'origine dell'emoperitoneo mortale potrebbero essere interpretate in questo senso anche nel nostro caso, mentre le lesioni degenerative del parenchima epatico appaiono correlabili agli effetti dell'ipoperfusione da shock emorragico. Nell'uomo le malattie epatiche fibropolicistiche sono trasmesse con modalità autosomica solitamente dominante (2); negli animali la trasmissione ereditaria è stata dimostrata con certezza solo nei gatti (14) e nei ratti di laboratorio (15-16) nel quadro di forme di ADPKD molto simili a quelle dell'uomo. La probabilità che anche nelle altre specie animali la malattia si trasmetta con le stesse modalità, associata al possibile insorgere di gravi complicazioni, sottolinea la necessità di monitorare adeguatamente la riproduzione degli animali selvatici in cattività, al fine di evitare che episodi di consanguineità possano favorire l'insorgere di patologie geneticamente trasmesse.

BIBLIOGRAFIA

1. Crawford JM: The liver and biliary tract. *In*: Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, 7th ed., pp. 877-937. WB Saunders, Philadelphia, 2005
2. Desmet VJ. Pathogenesis of ductal plate malformation. *J of Gastroenterology and Hepatology* 2004, 19: S356-S360.
3. Drenth JP, Tahvanainen E, Morsche RH. Abnormal hepatocystin caused by truncating PRKCSH mutations leads to autosomal dominant polycystic liver disease. *Hepatology* 2004, 39: 924-931
4. Peces R, Drenth JPH, Morsche, RHM, González P, Peces C. Autosomal dominant polycystic liver disease in a family without polycystic kidney disease associated with a novel missense protein kinase C substrate 80K-H mutation *World J Gastroenterol* 2005, 11:7690-7693.
5. Bosje JT, van den Ingh TSGAM, van der Linde-Sipman JS. Polycystic kidney and liver disease in cats. *Vet Q* 1998, 20:136-139.
6. Görlinger S., Rothuizen J., Bunch S., and van den Ingh T.S.G.A.M.. Congenital Dilatation of the Bile Ducts (Caroli's Disease) in Young Dogs. *J Vet Intern Med* 2003, 17:28-32
7. McAloose D, Casal M, Patterson DF, Dambach DM. Polycystic kidney and liver disease in two related West Highland White Terrier litters. *Vet Pathol* 1998, 35:77-81.
8. McKenna SC, Carpenter JL. Polycystic disease of the kidney and liver in the Cairn Terrier. *Vet Pathol* 1980, 17:436-442.
9. Haechler S, Van Den Ingh TSGAM, Rogivue C, Ehrensperger F, Welle M. Congenital Hepatic Fibrosis and Cystic Bile Duct Formation in Swiss Freiberger Horses. *Vet Pathol* 2000, 37:669-671.
10. Bettini G, Mandrioli L., Morini M. Bile duct dysplasia and congenital hepatic fibrosis associated with polycystic kidney (Caroli Syndrome) in a Rat. *Vet Pathol* 2003, 40:693-694.
11. Pettan-Brewer KC, Lowenstine LJ. Intrahepatic cysts and hepatic neoplasms in felids, ursids and other zoo and wild animals. *In*: Fowler ME and Miller ER (eds). *Zoo and Wild Animal Medicine. Current therapy* 4. WB Saunders Co., Philadelphia, pp 423-429.
12. Qian Q, Li AR, King BF, Kamath PS, Lager DJ, Huston J, III et al. Clinical profile of autosomal dominant polycystic liver disease. *Hepatology* 2003, 37(1):164-171.
13. Vauthey JN, Maddern GJ, Kolbinger P, Baer HU, Blumgart LH. Clinical experience with adult polycystic liver disease. *Br J Surg* 1992, 79:562-565.
14. Eaton KA, Biller DS, DiBartola SP, et al. Autosomal dominant polycystic kidney disease in Persian and Persian-cross cats. *Vet Pathol* 1997, 34:117-126.
15. Sanzen T, Harada K, Yasoshima M, Kawamura Y, Ishibashi M, Nakanuma Y: Polycystic kidney rat is a novel animal model of Caroli's disease associated with congenital hepatic fibrosis. *Am J Pathol* 2000, 158:1605-1612.
16. Lager DJ, Qian Q, Bengal RJ, Ishibashi M, Torres VE: The pck rat: a new model that resembles human autosomal dominant polycystic kidney and liver disease. *Kidney Int* 2001, 59:126-136.



Figura 1. Leone, maschio, 15 anni. Il soggetto presenta disinteresse per il cibo e lieve epistassi.



Figura 2. Leone, fegato. Neoformazioni policistiche di diverse dimensioni sparse nel parenchima epatico.



Figura 3. Leone, milza. Due voluminosi ematomi sulla superficie splenica.

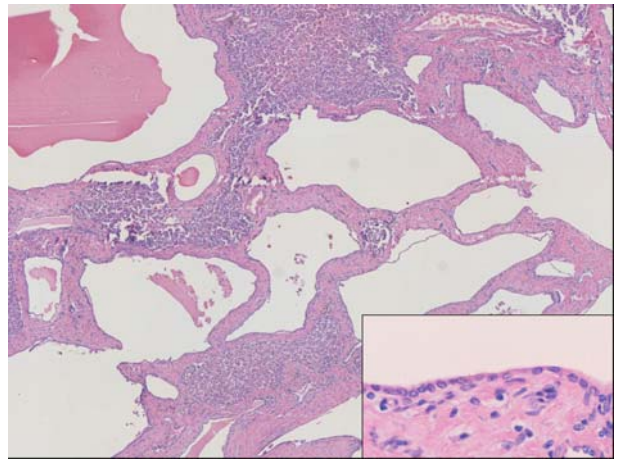


Figura 4. Leone, fegato, cisti epatobiliari multiple. Cisti di dimensioni variabili supportate da un esile strato di tessuto fibroso e rivestite da epitelio cubico. Ematossilina eosina, 5x (inserto 40x).

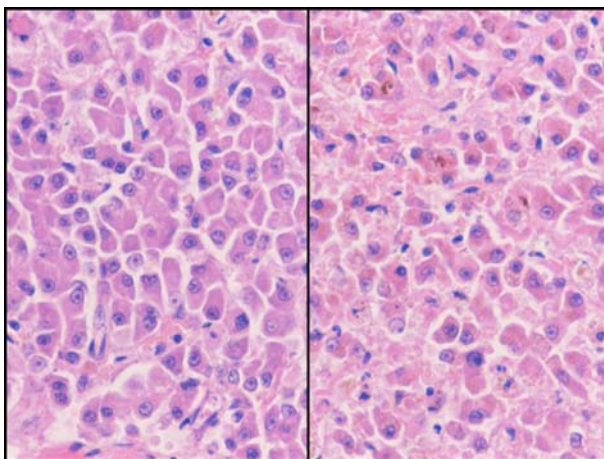


Figura 5. Leone, fegato. Gli epatociti appaiono fra loro dissociati e con individuali aspetti di microvacuolizzazioni, colostasi, necrosi e apoptosi. Ematossilina eosina, 40x.

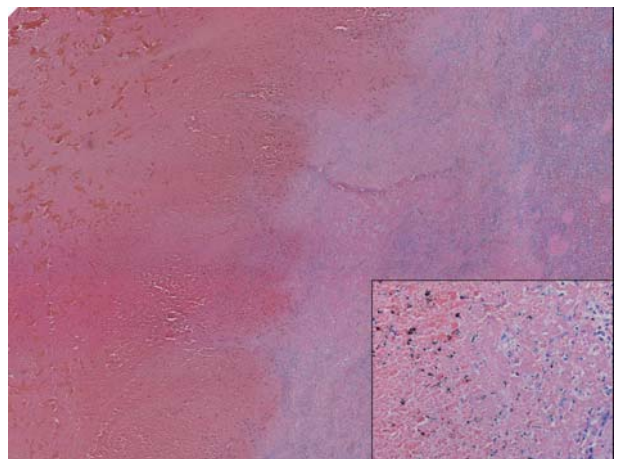


Figura 6. Leone, milza. Ematoma circondato da vallo fibroconnettivale. Ematossilina eosina, 5x (inserto 40x).

POLYCYSTIC BILE DUCT DISEASE IN A LION

Hepatic fibropolycystic diseases are a heterogeneous group of congenital lesions (von Meyenburg complexes, polycystic liver disease, congenital hepatic fibrosis, Caroli disease) in which the primary abnormality is the altered architecture of the intrahepatic biliary tree. The reported case concerns a 15-year-old male lion born in captivity with multiple hepatobiliary cysts, which died because of severe hemoperitoneum caused by copious peritoneal bleeding from ruptured splenic varices. Polycystic liver disease has been recognized in several domestic and wild species, and is usually reported as incidental and asymptomatic finding, although in humans several complications are contemplated, as portal hypertension, jaundice, ascites, peritoneal bleeding and aneurisms. Captive animal breeding should be actively monitored, in order to minimize the incidence of putatively inheritable diseases.

Keywords: lion, biliary cysts, polycystic liver disease, hemoperitoneum

PRINCIPALI REPERTI POST-MORTEM NEI CETACEI SPIAGGIATI LUNGO LE COSTE ITALIANE DAL 2000 ALL'INIZIO DEL 2006

¹Mazzariol Sandro, ⁴Di Guardo Giovanni, ⁴Marruchella Giuseppe, ^{2,3} Butti Camilla, ²Cozzi Bruno, Kennedy ⁵Seamus, ⁶Benazzi Cinzia, ⁷Fichtel Lara, ³Furlati Stefano, ⁸Zucca Paolo, ⁴Iorio Raffaella, ¹Castagnaro Massimo

¹ Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria, Università degli Studi di Padova, Viale dell'Università 16, 35020 Legnaro (PD), Italy. ² Dipartimento di Scienze Sperimentali Veterinarie, Università degli Studi di Padova, Viale dell'Università 16, 35020 Legnaro (PD), Italy. ³ Fondazione Cetacea Onlus, Via Ascoli Piceno, 47838, Riccione (RN), Italia ⁴ Dipartimento di Scienze Biomediche Compare, Università di Teramo, Piazza Aldo Moro, 64100 Teramo, Italia. ⁵ Department of Agriculture and Rural Development for Northern Ireland, Veterinary Sciences Division, Stormont, Belfast, Northern Ireland (UK). ⁶ Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sanità Animale, Università di Bologna, Ozzano Emilia (Bologna), Italia. ⁷ Oltremare, Riccione, Italia. ⁸ Università di Trieste, Trieste, Italia

I cetacei spiaggiati offrono un'opportunità unica per studiare lo stato di salute delle popolazioni a vita libera di delfini e balene. In questo lavoro vengono riportati i risultati degli esami *post-mortem* eseguiti su 18 odontoceti spiaggiati sulle coste italiane dal 2000 al 2006. Sono stati esaminati 8 tursiopi (*Tursiops truncatus*), sette stenella striate (*Stenella coeruleoalba*), un grampo (*Grampus griseus*), un delfino comune (*Delphinus delphis*) e un soggetto non identificato. Durante l'esame necroscopico sono stati campionati tessuti e lesioni, fissati in formalina e processati per l'istologia. La lesione riscontrata con maggiore frequenza è la polmonite, in particolare associata a parassitosi da *Halocercus lagenorhynchi*. Altri reperti importanti sono nefriti, epatiti e gastriti da *Pholeter gastrophilus*. In molti casi le lesioni hanno un'eziologia parassitaria. In una femmina di tursiope è stata descritta una meningoencefalite granulomatosa da *Cladosporium* spp. In altri due tursiopi femmina sono stati riscontrati lesioni esofitiche riferibili a papillomi sul rostro e in cavità orale. Altri reperti particolari sono il reperimento di tessuto renale ectopico nel polmone di un delfino comune e cisti periureterali congenite in un giovane grampo. In alcuni casi, l'esame batteriologico ha permesso di isolare agenti batterici con potenziale zoonotico, come *Vibrio alginolyticus*. La polmonite costituisce la patologia più frequente riscontrata nei cetacei esaminati in questo lavoro. Come in altri studi simili, anche in questo caso i parassiti rappresentano gli agenti eziologici segnalati più spesso, anche se i danni tissutali da loro provocati non sembrano rappresentare un pericolo per la vita dell'animale infestato.

Parole chiave: Cetacei spiaggiati, delfini, polmonite parassitaria, parassiti

POST-MORTEM FINDINGS IN CETACEANS STRANDED ON THE ITALIAN COASTLINE BETWEEN 2000 AND THE EARLY 2006

Stranded cetaceans offer an unique opportunity for collecting data on the health status of dolphin and whale free-living populations. We report herein the *post-mortem* findings observed in 18 odontocetes found stranded between 2000 and 2005 along the Italian coastline. Seven bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*), seven striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*), two Risso's dolphins (*Grampus griseus*), one common dolphin (*Delphinus delphis*) and one unidentified delphinid were investigated. During *post-mortem* examination their tissues were formalin-fixed and subsequently processed for histopathology. Pneumonia was one of the most commonly encountered lesions, especially *Halocercus lagenorhynchi*-associated bronchopneumonia. Additional findings included nephritits, hepatitis and *Pholeter gastrophilus*-associated gastritis. In many cases parasites were often found in most of the examined organs and tissues. Granulomatous meningoencephalitis by *Cladosporium* spp. was observed in a female bottlenose dolphin, while papilloma-like lesions were observed on the rostrum and in the oral cavity of other two female bottlenose dolphins. Other peculiar findings were heterotopic renal tissue in the lung parenchyma of the common dolphin and adrenocortical pseudocystic lesions and congenital periureteral cysts in two different Risso's dolphins. In a few cases, putative zoonotic agents, such as *Vibrio alginolyticus*, were isolated from stranded dolphins. In agreement with other authors, parasites were the most frequently encountered pathogens but, despite noticeable tissue damage, they were not life-threatening organisms. Pneumonia was a very common disease condition in the cetaceans included in this study.

Keywords: Stranded cetacean, dolphins, parasitic pneumonia, parasites

STUDIO PATOGENETICO DELL'INFEZIONE SPERIMENTALE CON VIRUS INFLUENZALE AD ALTA PATOGENICITA' H5N1 IN ANATRE DI PECHINO

Vascellari Marta, Granato Anna, Basilicata Lara, Trevisan Laura, Mutinelli Franco

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Laboratorio Istopatologia, Viale dell'Università
10, 35020 Legnaro (PD)*

Sono state utilizzate 19 anatre Pechino (Pekin Duck), di cui cinque sono state vaccinate ad 1 giorno di vita con 0,5 ml SC e a 4 settimane con 1 ml SC di vaccino inattivato H5N2; le restanti quattordici non sono state vaccinate. Tutti i soggetti sono stati infettati per via oro-nasale con 100 µl contenenti 10⁷EID₅₀ di virus ad alta patogenicità H5N1 (A/Duck/Vietnam/12/05), 3 settimane dopo la seconda vaccinazione. Gli animali morti o sacrificati sono stati sottoposti a necropsopia e campioni di organi ad esame istologico, immunohistochimico (IHC) e ibridazione in situ (ISH).

In tutti i soggetti vaccinati non si è rilevata sintomatologia. Gli animali non vaccinati hanno evidenziato sintomatologia nervosa e sono venuti a morte dal secondo giorno P.I. L'esame necroscopico non ha evidenziato lesioni nelle anatre vaccinate, mentre in quelle non vaccinate si sono osservate emorragie nel tratto gastroenterico, trachea, pancreas ed encefalo.

In tutti gli animali vaccinati non sono state riscontrate alterazioni istologiche né positività all'IHC e ISH. In cinque soggetti non vaccinati e venuti a morte spontaneamente sono state riscontrate lesioni necrotiche multifocali nel pancreas, malacia della sostanza bianca e rari focolai di astrocitosi nell'encefalo. L'esame IHC ha evidenziato la presenza dell'antigene della NP virale associato alle cellule acinose del pancreas, ai neuroni e agli astrociti dell'encefalo. L'ISH ha confermato, in tutti i campioni, la positività riscontrata mediante prova IHC, evidenziando tuttavia una maggiore distribuzione e intensità della reazione positiva. Inoltre, l'ISH ha evidenziato la presenza dell'antigene virale in alcune sezioni di encefalo risultate negative alla prova IHC e nelle cellule nervose del plesso sottomucoso dell'intestino.

I risultati della sperimentazione evidenziano l'efficacia della vaccinazione effettuata con vaccino inattivato H5N2 nell'anatra. Negli animali non vaccinati ed infettati sperimentalmente si è evidenziato tropismo del virus H5N1 per le cellule nervose, oltre che per quelle acinose del pancreas. Quanto osservato è sovrapponibile, anche se con aspetti di maggiore intensità, ai quadri osservati nell'infezione spontanea di anatre con virus dell'influenza aviaria ad alta patogenicità. Si sottolinea inoltre l'utilità delle metodiche IHC e ISH nello studio della patogenesi dell'infezione da virus influenzali.

Parole chiave: anatra, influenza aviaria, immunohistochimica, ibridazione *in situ*

PATHOGENESIS OF THE EXPERIMENTAL INFECTION WITH THE HPAI H5N1 IN PECKIN DUCKS

The challenge of vaccinated (n = 5) and unvaccinated (n = 14) Pekin ducks has been carried out with 100µl containing 10⁷ EID₅₀ of the HPAI virus (A/Duck/Vietnam/12/05), administered to all the ducks by IN and oral route. All the vaccinated ducks showed to be healthy throughout the period of the clinical monitoring. All unvaccinated ducks showed signs of disease starting from day 2 PI. On post-mortem examination haemorrhages were observed along the whole intestine tract and in stomach, gizzard, trachea, pancreas and brain. Tissues underwent histological examination, IHC and ISH. Histological lesions, as well as IHC positivity, were recorded in pancreas and brain of unvaccinated ducks. The ISH revealed viral antigen associated with acinar pancreatic cells and with nervous cells of the CNS and gut. Experimental findings agree with those previously observed in naturally infected ducks with HPAI virus.

Keywords: duck, avian influenza, immunohistochemistry, in situ hybridisation

STATO SANITARIO E PATOLOGIA DELLA NUTRIA (*Myocastor coypus*)

Bollo Enrico¹, Pregel Paola¹, Gennero Silvia², Rosati Sergio³, Nebbia Patrizia³, Ferroglia Ezio³, Biolatti Pier Giuseppe⁴

¹Università degli Studi di Torino, Dipartimento di Patologia Animale, Via L. da Vinci 44, 10095 Grugliasco (TO); ²Istituto Zooprofilattico del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Sezione di Torino, Via Bologna 148, 10154 Torino; ³Università degli Studi di Torino, Dipartimento di Produzioni Animali, Epidemiologia ed Ecologia, Via L. da Vinci 44, 10095 Grugliasco (TO); ⁴Istituto Zooprofilattico del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Sezione di Cuneo, Via S. Pertini 11, Fraz. San Rocco Castagneretta, 12100 Cuneo.

La nutria (*Myocastor coypus*) è un roditore erbivoro di media taglia originario del Sud-America importato in Europa negli anni '60 del secolo scorso. La presenza di tale specie, che predilige zone di pianura ricche di acqua, comporta in molte aree gravi problematiche per le coltivazioni adiacenti e le arginazioni dei canali d'irrigazione, e può svolgere un ruolo non trascurabile nella diffusione e nel mantenimento di alcune patologie. Nel presente lavoro, 141 esemplari di nutria sono stati sottoposti a cattura in due aree protette del Piemonte, con l'ausilio di gabbie metalliche tipo "Larsen", nell'ambito dei piani di contenimento. A seguito di eutanasia, gli esemplari di nutria sono stati sottoposti ad esame anatomico-patologico, sierologico, batteriologico e parassitologico macroscopico sul contenuto intestinale.

All'esame anatomico-istopatologico il polmone è risultato l'organo maggiormente colpito, con lesioni attribuibili prevalentemente alle modalità di soppressione degli animali e a polmonite non purulenta. Il fegato ha presentato processi infiammatori in atto e loro esiti, nonché lesioni di natura parassitaria. A carico del rene sono stati evidenziati prevalentemente fenomeni di nefrite interstiziale non purulenta e un singolo caso di adenocarcinoma. Gli esami sierologici hanno rivelato positività per *Leptospira bratislava* (87 sieri su 90 sottoposti a test; 11,5%), *L. ichterohaemorrhagiae* (3 su 87; 3,4%), *Toxoplasma gondii* (15 su 41; 36,6%) e per il virus dell'encefalomiocardite (5 su 78; 6,4%). All'esame batteriologico sono stati ottenuti 25 ceppi morfologicamente ascrivibili a *E. coli* EPEC, mentre non è stato isolato alcun ceppo di *Salmonella*, *Shigella* e *Pseudomonas*. L'esame parassitologico ha fornito in tutti i soggetti esito negativo.

In conclusione, si può affermare che i riscontri di ordine sanitario non sono tali da far supporre la presenza nella popolazione esaminata di gravi patologie, responsabili di rischi per le specie presenti nell'areale oggetto di studio o per l'uomo. È tuttavia indispensabile una continua attività di sorveglianza e di monitoraggio sanitario, al fine di evidenziare e possibilmente prevenire eventuali rischi sanitari per la fauna selvatica e per l'uomo, con particolare riferimento alla leptospirosi.

Parole chiave: nutria, patologia

HEALTH STATUS AND PATHOLOGY OF NUTRIA (*Myocastor coypus*)

One-hundred forty-one trapped nutria (*Myocastor coypus*) from two protected areas of Piedmont (Italy), were examined for the prevalence for lesions in major viscera, selected serum antibodies, and enteric bacteria and parasites. The lungs showed a prevalence of nonsuppurative interstitial pneumonia. Lesions in the liver included non suppurative hepatitis, cholangitis, calcification and necrosis. Renal lesions were nonsuppurative interstitial nephritis and a single case of renal adenocarcinoma. Ten of 87 sera (11.5%) had antibodies against *Leptospira bratislava*, 3 of 87 (3.4%) against *L. ichterohaemorrhagiae*, 15 of 41 (36.6%) against *Toxoplasma gondii*, and antibodies against encephalomyocarditis virus were detected in 5 of 78 sera (6.4%). Twenty-five strains of EPEC *E. coli* were isolated from the intestinal content, and all fecal samples were negative for *Salmonella*, *Shigella* and *Pseudomonas*. No parasites were detected at the gross parasitological examination.

Keywords: nutria, pathology

CITOLOGIA ASPIRATIVA CON AGO SOTTILE IN 20 CASI DI PATOLOGIA RENALE DEL CANE

Militerno Gianfranco, Franconeri Lorena, Vezzali Enrico

Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale – Servizio di Anatomia Patologica –
Facoltà di Medicina Veterinaria – Alma Mater Studiorum, Università di Bologna

Campioni citologici di 20 patologie renali del cane sono stati esaminati dopo prelievo agoaspirativo in sede autoptica (15 casi), post-operatoria (nefrectomia di 2 casi) e, solo in 3 casi, durante indagine ecografica. La diagnosi citologica è stata seguita da quella istologica nel 95% dei casi (19 su 20). Sono state considerate lesioni renali, neoplastiche e non, focali o diffuse, in 10 femmine e 10 maschi, con *range* di età da 4 mesi a 16 anni (media 8 anni).

I casi erano accompagnati da anamnesi clinica, rilievi strumentali e di laboratorio (aumento di BUN, creatinina) indicativi di un'afezione renale.

Sono state usate siringhe da 5 ml ed aghi di 22G, lunghi 3-4 cm o 9-12 cm (aghi spinali), questi ultimi impiegati nei tre prelievi percutanei eco-guidati. Nelle lesioni circoscritte, il prelievo è stato realizzato inserendo l'ago direttamente nella lesione, procedura di facile esecuzione quando eco-guidata. Nelle lesioni diffuse, ben visibili solo in sede autoptica, l'ago è stato infisso in modo casuale nella corticale renale del polo craniale o caudale. Nelle lesioni multifocali l'ago è stato diretto in focolai di piccole dimensioni, anch'essi di facile identificazione in sede necroscopica.

Dai preparati, colorati con May Grünwald-Giemsa, sono emersi 3 quadri compatibili con *nefrite linfocitaria*, 8 quadri di degenerazione (idropica, vacuolare, a gocce ialine, steatosi), di cui uno con deposito di ossalati nell'avvelenamento da glicole etilenico. La lesione *target* della citologia renale è risultata la neoplasia, diagnosticata nello studio in 9 casi; un tumore del bacinetto è stato diagnosticato come epiteliale, trattandosi invece di un fibroma.

Parole chiave: citologia renale, agoaspirato, istopatologia, cane

INTRODUZIONE

Venti quadri patologici renali, neoplastici e non, focali o diffusi, sono stati indagati con citologia ago-aspirativa in 15 cani in sede autoptica, in due dopo nefrectomia e solo in tre dopo identificazione ecografica e prelievo eco-guidato. La diagnosi citologica è stata seguita da quella istologica nel 95% dei casi (19 su 20) (Tabella).

MATERIALI E METODI

Per i prelievi sono state usate siringhe da 5 ml ed aghi di 22G lunghi da 3-4 cm fino a 9-12 cm (aghi spinali), questi ultimi impiegati nei tre prelievi percutanei eco-guidati. Nelle lesioni focali l'ago è stato inserito direttamente nella lesione, operazione facile in sede autoptica, nei reni asportati o resa agevole dall'ecografia in tre casi.

Nelle lesioni diffuse, invece, ben visibili solo in sede autoptica, l'ago è stato infisso in modo

casuale nella corticale renale craniale o caudale, evitando penetrazioni profonde.

Le lesioni multifocali sono state indagate cercando di colpire con l'ago anche focolai di piccole dimensioni, anch'essi facili da vedere in sede autoptica.

I casi sono stati seguiti dall'istologia, tranne uno sottoposto solo ad indagine citologica. Campioni di tessuto sono stati fissati in formalina tamponata e poi processati, inclusi in paraffina, tagliati in sezioni di 5 μ e colorati con Ematossilina-Eosina od altri metodi.

Gli strisci sono stati essiccati all'aria, colorati con May Grünwald-Giemsa, coperti con vetrino coprioggetto ed esaminati al microscopio.

Il lavoro è stato effettuato al fine di studiare e valutare la capacità della citologia nel riconoscere le lesioni neoplastiche e, tra queste, il tipo di tumore presente e di definire, inoltre, alcuni elementi in grado di caratterizzare quadri infiammatori e/o regressivi-degenerativi focali-multifocali-

diffusi, causa d'insufficienza dell'emuntorio renale.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Dallo studio sono emersi 3 quadri compatibili con *nefrite con infiltrati linfocitari* (6, 9, 18, Tabella). A piccolo ingrandimento si notava un fondo ricco di emazie ben conservate, numerose cellule epiteliali isolate od in piccoli aggregati, linfociti, frammenti tubulari, rari glomeruli, materiale amorfo. I glomeruli apparivano come strutture multilobulate, pluristratificate contenenti vasi capillari convoluti. Le cellule epiteliali, soprattutto di origine tubulare, a più forte ingrandimento (Ob. 20/40X) apparivano cuboidali, con nucleo rotondo, citoplasma lievemente basofilo, talvolta con microvacuoli od assente per rottura durante l'esecuzione dello striscio. I piccoli e medi linfociti erano poco più grandi di un globulo rosso (9-12 μ), rotondeggianti, con citoplasma scarso od assente, cromatina compatta, nucleoli spesso non visibili. Inoltre, erano osservabili alcuni cilindri eosinofili. Cilindri cellulari sono stati reperiti in tutti i casi caratterizzati da estesi fenomeni degenerativi/necrotici, flogistici e, soprattutto, tumorali. Il sospetto citologico di nefrite in questi tre casi è risultato molto forte per l'alto numero di leucociti presenti (almeno 5 o più per campo, Ob. 40X). L'istologia confermava il sospetto citologico, mostrando una chiara infiltrazione tubulo-interstiziale linfocitaria, iperemia, vari gradi di sofferenza glomerulo-tubulare (degenerazione/necrosi, esfoliazione cellulare epiteliale intra-luminale).

Anche in tre quadri degenerativi renali erano presenti aspetti compatibili con nefrite linfocitaria (3, 13, 15, Tabella). In due si evidenziavano aspetti degenerativi caratterizzati da glomeruli circondati da materiale amorfo debolmente eosinofilo, disposto in fasci, e porzioni tubulari rigonfie, d'aspetto "ialinizzato" a volte così imponente da rendere il tubulo quasi "obsolescente", simile ad un cilindro ialino (Fig. 1). Granuli scuri intra-citoplasmatici e di significato ignoto erano osservabili in tratti di anse di Henle o di tubuli contorti distali. In altri campi, il citoplasma delle cellule tubulari presentava vacuoli compatibili con aspetti di

degenerazione a gocce ialine, idropico/vacuolare, steatosi (Fig. 2). Altri 5 casi sono stati giudicati semplici quadri degenerativi diffusi (4, 7, 12, 16, 20, Tabella), ma è risultato difficile definirne l'eziologia. In uno (12, Tabella) sono stati osservati numerosi cristalli di ossalato di calcio monoidrato a forma di "listello di palizzata" o frammentati in corte strutture bipolari (Fig. 3). Erano presenti anche cilindri eritrocitari e granulosi ed in alcuni nuclei apparivano cristalli intranucleari di forma regolare, anch'essi di origine ignota e comuni ad altre nefropatie. Si notavano aspetti di rigenerazione tubulare: ampi citoplasmi basofili, nuclei voluminosi, polinucleoliosi. L'esame istologico ha confermato la tubulonefrosi da ossalati, caratterizzata da birifrangenza in luce polarizzata dei cristalli, accanto a glomerulonefrosi membranosa/ialina.

Tra i 9 tumori indagati, due erano *carcinomi renali* (1, 2, Tabella) caratterizzati da ipercellularità con cellule epiteliali isolate o riunite in aggregati poco coesi. Tali cellule mostravano pleomorfismo e margini poco definiti, rapporto N:C elevato, anisocariosi e nucleoli multipli e prominenti, citoplasma occupato da vacuoli otticamente vuoti e di grandezza variabile. Uno dei due è risultato un *carcinoma renale a cellule chiare* con citoplasma abbondante e vacuolizzato (Fig. 4). L'esame istologico ha confermato il quadro. Anche un *adenoma cortico-surrenalico bilaterale* (11, Tabella), posto in diagnosi differenziale con il carcinoma renale a cellule chiare per la localizzazione polare, presentava pleomorfismo moderato, cellule spesso isolate od in piccoli *clusters*; ma lievemente più grandi con margini più definiti e citoplasma con vacuoli pleomorfi (Fig. 5). Da una metastasi renale di *carcinoma polmonare* (14, Tabella) sono emerse piccole cellule epiteliali, disposte in strutture acinose simili a sacchi alveolari polmonari. L'istologia dimostrava un *pattern* neoplastico papillare-dendritico con fibrosi interstiziale.

2 casi di *carcinoma a cellule di transizione* (8, 10, Tabella) con *metaplasia mucosa e squamosa* hanno mostrato alta cellularità, *clusters* di dimensioni variabili e margini irregolari. Le cellule erano moderatamente pleomorfe, con nucleoli evidenti o duplici, citoplasma chiaro o grigio-bluaastro per

metaplasia squamosa, rapporto nucleo/citoplasma variabile. Altre erano simili a cellule ad “anello con castone” (*signet ring cells*). Con metodo Alcian-PAS era possibile evidenziarne l’aspetto mucoso.

Nel quadro citologico di un fibroma (17, Tabella) mancavano le cellule fusate, isolate od in aggregati, che caratterizzano il tessuto fibroso. La cellularità era alta e costituita da aggregati uroteliali, a volte con chiari aspetti di metaplasia squamosa. A forte ingrandimento si riuscivano ad apprezzare lieve pleomorfismo, nuclei ovali/allungati, nucleoli evidenti, a volte multipli, ampi citoplasmi moderatamente basofili, che facevano sospettare una neoplasia epiteliale benigna pielo-ureterale transizionale od una forma maligna a basso grado. L’esame istologico evidenziava una proliferazione benigna del tessuto fibroso sub-mucosale del bacinetto. La diagnosi citologica di fibroma può essere risultata inefficace perchè l’ago non è stato in grado di prelevare cellule mesenchimali benigne ben coese, ma solo elementi uroteliali lievemente iperplastici. In un emangiosarcoma (5, Tabella), confermato con l’istologia, era spiccato il pleomorfismo cellulare, con dimensioni variabili ed aspetti giganto-cellulari, citoplasma assente o basofilo, nuclei pleomorfi e macronucleoli. Un *nefroblastoma* (19, Tabella) è stato sospettato da strisci dal fondo lievemente eosinofilo con materiale necrotico amorfo, frammenti tubulari, cilindri cellulari, pochi glomeruli e cellule isolate pleomorfe. A forte ingrandimento era evidente un *pattern* misto di cellule epiteliali e fusate in egual misura, tipiche del nefroblastoma.

CONCLUSIONI

La citologia è risultata utile nel riconoscere le lesioni focali tumorali, permettendo anche d’individuare l’origine epiteliale, mesenchimale o mista (nefroblastoma) ed il grado di malignità in 8 casi su 9. In un caso, un fibroma del bacinetto è stato diagnosticato come tumore epiteliale benigno od a basso grado. La cito-diagnostica su lesioni

multifocali/diffuse, osservate in sede autoptica, ha svelato aspetti compatibili con quadri degenerativi e/o infiammatori. Nelle patologie degenerative, dai quadri più attendibili rispetto a quelli infiammatori, la natura esatta della lesione sarebbe stata svelata solo grazie all’uso di tecniche citochimiche che avrebbe, però, vanificato i tempi rapidi della citologia.

Il rilievo di cristalli prismatici di ossalato di calcio monoidrato, ha indotto anche a sospettare la causa esatta della nefrosi (glicole etilenico).

La patologia del glomerulo è risultata di difficile interpretazione, in accordo con quanto riportato in letteratura.

La principale difficoltà interpretativa della citologia di un presunto processo flogistico è stata discriminare tra i leucociti ematici e quelli in corso d’infiammazione. Inoltre, se l’area campionata non coincideva con le zone infiltrate, la cito-diagnosi poteva condurre ad un falso negativo.

Altre osservazioni sono necessarie per definire meglio tali aspetti.

Riteniamo che l’esame citologico del rene possa avere un ruolo importante nella diagnostica clinica per riconoscere in tempi veloci condizioni di normalità e, soprattutto, la natura di lesioni occupanti spazio, permettendo a volte di sospettare quadri degenerativi o flogistici interstiziali.

Inoltre, rappresenta un primo, semplice, poco invasivo ed economico approccio alle nefropatie da cui ottenere informazioni utili che, opportunamente integrate con altri dati, coadiuvano la diagnosi, indirizzando, in casi dubbi, verso l’esame istologico od ulteriori indagini.

BIBLIOGRAFIA

1. Borjesson DL (2003): *Renal cytology*. Vet Clin North Am Small Anim Pract 33(1), 119-134.
2. Meinkoth JH et al (1999): *The Renal Parenchyma*. In ‘Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat’ (Cowell RL, Tyler RD, Meinkoth JH, eds). Mosby, St. Louis, 203-210.

Tabella				
N. CASI	RAZZA/ SESSO/ETA'	PRELIEVO	DIAGNOSI CITOLOGICA	DIAGNOSI ISTOLOGICA
1	Pastore tedesco F, 10 anni	Ago-aspirato da lesione focale renale in sede autoptica	Carcinoma renale	Carcinoma renale tubulo papillare tendente al solido
2	Meticcio M, 16 anni	Ago-aspirato eco-guidato da lesione focale renale	Carcinoma renale a cellule chiare con presenza di cilindri cellulari	Conferma il carcinoma renale a cellule chiare
3	Meticcio M, 7 anni	Ago-aspirato in sede autoptica	Nefropatia degenerativa con aspetti infiammatori linfocitari	Nefrite interstiziale a focolai, nefrosclerosi
4	Alano M, 6 anni	Ago-aspirato in sede autoptica	Stasi ematica renale associata a quadro degenerativo diffuso	Stasi ematica acuta renale e glomerulo- e tubulonefrosi diffuse
5	Boxer M, 6 anni	Ago-aspirato da lesione focale renale destra in sede autoptica	Sospetto emangiosarcoma	Emangiosarcoma renale
6	Meticcio F, 6/7 anni	Ago-aspirato in sede autoptica	Quadro compatibile con nefrite con infiltrati linfocitari	Nefrite interstiziale a focolai sparsi con infiltrati prevalentemente linfocitari
7	Meticcio M, 12 anni	Ago-aspirato in sede autoptica	Nefropatia degenerativa e desquamativa/autolitica post-mortale	Glomerulo- e tubulonefrosi miste ad alterazioni cadaveriche autolitiche
8	Setter M, 7 anni	Ago-aspirato eco-guidato da lesione focale renale sinistra	Carcinoma a cellule di transizione (TCC), metaplasia mucosa e squamosa	Conferma il TCC con metaplasia mucosa e squamosa
9	Boxer F, 3 anni	Ago-aspirato in sede autoptica	Nefrite caratterizzata da presenza di linfociti	Nefrite interstiziale a focolai sparsi con infiltrati prevalentemente linfocitari
10	Pastore scozzese F, 11 anni	Ago-aspirato in sede autoptica da lesione focale pelvi renale destra	TCC con aspetti di metaplasia squamosa e nefrite acuta	TCC con aspetti di metaplasia squamosa e nefrite acuta
11	Meticcio F, 11 anni	Ago-aspirato eco-guidato da lesione focale surrenalica bilaterale	Adenoma cortico-surrenalico bilaterale	Adenoma cortico-surrenalico bilaterale
12	Meticcio M, 11 anni	Ago-aspirato in sede autoptica	Tubulonefrosi da ossalati con aspetti di rigenerazione tubulare, cilindri	Glomerulonefrosi diffusa, tubulonefrosi da ossalati, nefrite tubulo-interstiziale
13	Meticcio F, 7 anni	Ago-aspirato in sede autoptica	Glomerulonefrosi e tubulonefrosi con sospetta nefrite linfocitaria	Glomerulonefrosi e tubulonefrosi con nefrite interstiziale
14	Alano M, 8 anni	Ago-aspirato da lesioni multiple renali bilaterali in sede autoptica	Sospetta neoplasia epiteliale maligna di origine metastatica (polmonare)	Carcinoma polmonare papillare-dendritico metastatico
15	Meticcio F, 7 anni	Ago-aspirato in sede autoptica	Glomerulonefrosi e tubulonefrosi a gocce ialine con sospetta nefrite linfocitaria	Glomerulonefrosi e tubulonefrosi ialina nefrite tubulo-interstiziale cronica focale
16	Dalmata FS, circa 7 anni	Ago-aspirato in sede autoptica	Compatibile con glomerulonefrosi e tubulonefrosi a gocce ialine	Glomerulonefrosi membranosa e tubulonefrosi ialina diffuse
17	Beagle F, 11 anni	Ago-aspirato dopo nefrectomia da lesione pielo-ureterale destra	Neoplasia transizionale benigna/maligna a basso grado, metaplasia squamosa	Fibroma
18	Meticcio M, 4 mesi	Ago-aspirato in sede autoptica	Compatibile con nefrite prevalentemente linfocitaria	Nefrite tubulo-interstiziale con infiltrati prevalentemente linfocitari
19	Pastore tedesco M, 5 anni	Ago-aspirato dopo nefrectomia da lesione focale renale	Compatibile con nefroblastoma	–
20	Pastore tedesco F, 4 anni	Ago-aspirato in sede autoptica da soggetto positivo per Leishmania	Quadro compatibile con glomerulo- e tubulonefrosi a gocce ialine	Nefrosi, glomerulonefrite membrano-proliferativa e nefrite interstiziale

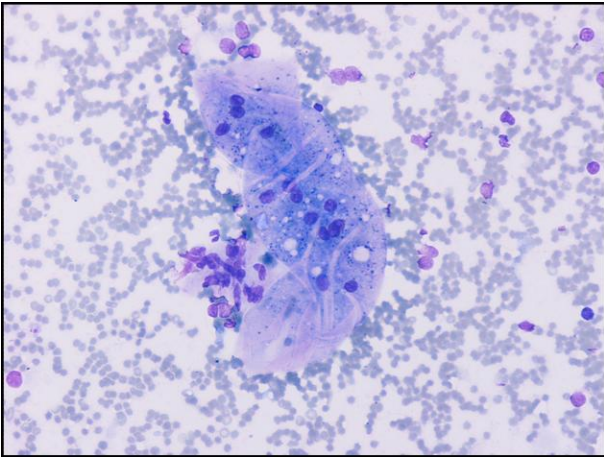


Figura 1. FNAC: aspetti regressivi/degenerativi in un segmento di tubulo rigonfio, debolmente eosinofilo e simile ad un cilindro ialino, contenente granulazioni scure di origine ignota. MGG. Ob. 20X.

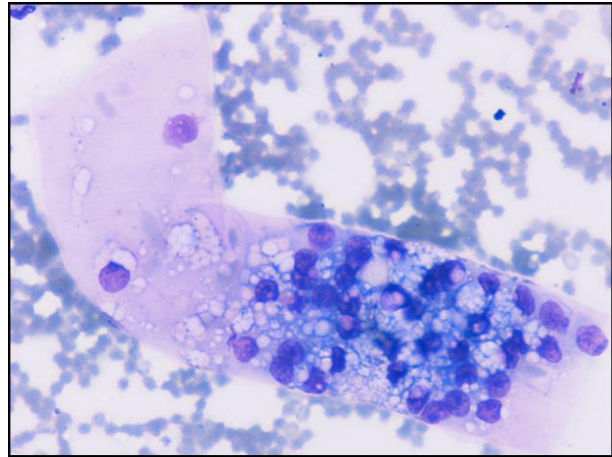


Figura 2. FNAC: vacuoli in corso di degenerazione a gocce ialine, idropico/vacuolare, steatosi. MGG. Ob. 40X.

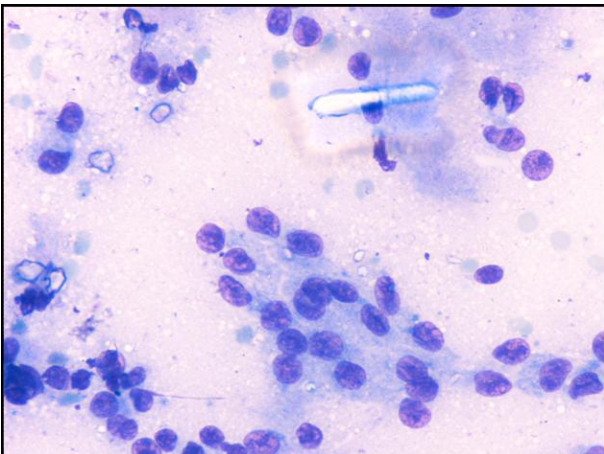


Figura 3. FNAC: cristalli di ossalato di calcio monoidrato frammentati od a "listello di palizzata" ed aspetti di rigenerazione tubulare. MGG. Ob. 40X.

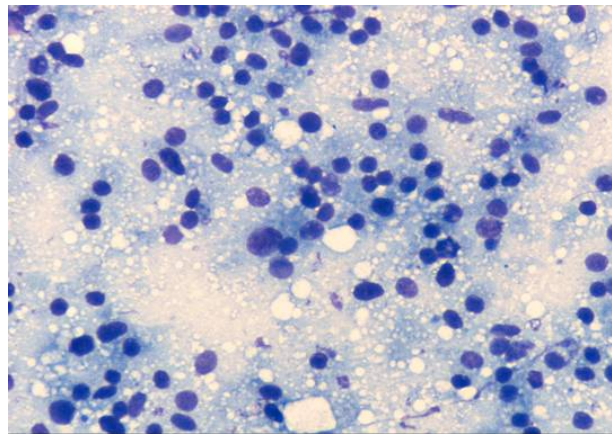


Figura 4. FNAC: cellule pleomorfe con margini poco definiti, rapporto N:C elevato, anisocariosi e nucleoli multipli/prominenti, citoplasma vacuolizzato in un caso di carcinoma renale a cellule chiare. MGG. Ob.40X.

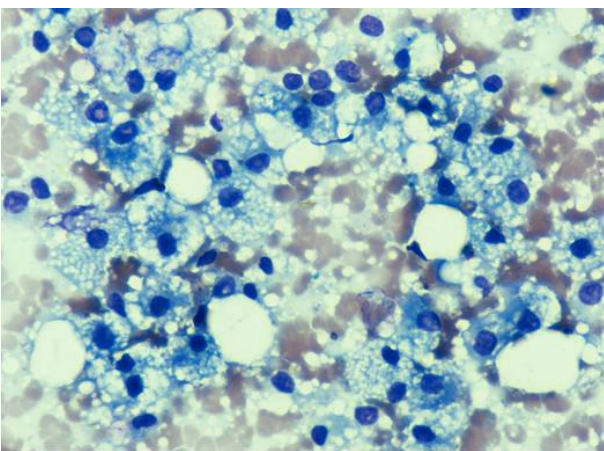


Figura 5. FNAC: cellule moderatamente pleomorfe, isolate od in piccoli *clusters*; con margini definiti e citoplasma con vacuoli pleomorfi in un caso di adenoma cortico-surrenalico bilaterale. MGG. Ob. 40X.

FINE NEEDLE ASPIRATION CYTOLOGY (FNAC) IN 20 CASES OF RENAL PATHOLOGY OF THE DOG

Cytologic evaluation of specimens obtained by fine needle aspiration biopsy from 20 canine renal lesions was performed during necropsy (15 cases), after surgical nephrectomy (2 cases) and during ultrasound investigation (3 cases). In 95% of cases (19 out of 20) histological diagnosis followed cytology. This work examined focal or diffuse, neoplastic and non-neoplastic renal lesions in 10 females and 10 males, from 4 months to 16 years of age (average 8). Anamnesis, clinical data, imaging and blood examinations (increased BUN, creatinine) showed renal pathology.

Sampling was accomplished using 5 ml syringes and 22 gauge needles, 3-4 or 9-12 cm (spinal-type needles), the last used for percutaneous ultrasound-guided biopsy.

FNAC was performed easily in focal lesions, even during ultrasound examination. In diffuse lesions, detected during autopsy, the needle was inserted randomly cranially or caudally in the renal cortex. In multifocal lesions needle was inserted in small foci easily observed during necropsy, too.

Cytological smears, stained with May Grünwald-Giemsa, were coherent to lymphocytic nephritis in 3 cases, degenerative changes (hydropic, vacuolar, hyaline, fatty) were detected in 8 cases, one of which characterized by oxalates deposition due to ethylene glycol poisoning. The *target* of renal cytology was the focal neoplastic lesion, detected in 9 cases; in one case fibroma was diagnosed as benign epithelial neoplasm of the renal pelvis.

Keywords: renal cytology, FNAC, histopathology, dog

VALUTAZIONE DELLA FRAZIONE APOPTOTICA CONDROCITARIA IN FRAMMENTI OSTEOCONDROTICI DI CAVALLO

Bongiovanni Laura¹, Grasselli Aldo¹, Grigolo Brunella², Muttini Aurelio³,
Della Salda Leonardo¹

¹Dipartimento di scienza Biomediche e Comparete – Università degli Studi di Teramo. ²Laboratorio di Immunologia e Genetica – Istituto di Rierca Codivilla Putti – Istituti Ortopedici Rizzoli.

³Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie – Università degli Studi di Teramo.

Scopo del presente lavoro è stato di analizzare il ruolo dell'apoptosi nella patogenesi e nella progressione dell'OCD (osteocondrosi dissecante) e OA (osteoartrite) equina, al fine di valutare, in maniera preliminare, la validità di utilizzo dei frammenti osteocondrali come fonte di condrociti per il trapianto condrocitario autologo, applicato con successo soltanto in via sperimentale, in questa specie. Le estremità distali del metacarpale principale di 8 cavalli macellati e frammenti cartilaginei di 14 cavalli con sintomatologia clinica riferibile a OCD, sono stati processati per analisi istopatologica. L'Apoptosi è stata valutata mediante metodica TUNEL e l'espressione immunohistochimica della caspase 3 in forma attiva è stata determinata utilizzando una metodica a fosfatasi alcalina. Abbiamo riscontrato un maggior numero di cellule TUNEL-positive ed un aumento di espressione della caspase 3 attiva nei frammenti osteocondrotici rispetto alle cartilagini di controllo. Le positività apparivano tuttavia ridotte di numero in quei campioni che presentavano una completa perdita della normale architettura cartilaginea ed aree di necrosi. Entrambi i parametri (indice TUNEL ed Indice Caspase 3 attiva) mostravano una bassa correlazione con il grado di severità delle lesioni OCD. I nostri risultati sottolineano l'importanza del ruolo dell'apoptosi nella patogenesi del complesso OCD/OA del cavallo, in particolare nella progressione della patologia, palesando il fatto che la via apoptotica condrocitaria si esplica mediante l'attivazione della caspase 3. Riguardo la possibilità di utilizzare frammenti osteocondrotici come fonte di condrociti per ACT, i nostri dati preliminari dimostrano il verificarsi del processo apoptotico, ma non a carico di tutte le cellule presenti, alcune delle quali potrebbero essere ancora in grado di replicare.

Parole chiave: Cavallo, osteocondrosi, OCD, apoptosi, caspase 3.

CHONDROCYTE APOPTOSIS IN EQUINE OSTEOCHONDRAL FRAGMENTS

This study was carried out to investigate the role of apoptosis in the pathogenesis of equine OCD (osteocondrosis dissecans) and OA (osteoarthritis). It represents a preliminary study to predict the possibility of using these fragments as a source of chondrocytes cultures for ACT (autologous chondrocytes implantation) technique. Eight normal distal ends of principal metacarpal of abattoir horses and osteochondral fragments from 14 horses with clinical symptoms of OCD were processed for histopathological investigations. Apoptosis was evaluated performing TUNEL method, and immunohistochemical expression of active caspase 3 was determined using a AP technique. We found an higher number of TUNEL-positive cells and an increased active caspase 3 expression in osteochondral fragments rather than in control cartilage. Positivities decreased in samples showing a completely lack of normal cartilage architecture and necrosis areas. Both TUNEL and Caspase3 Indexes showed a low correlation between the number of positive cells and the OCD severity. Our results seem to remark the important role of apoptosis in the pathogenesis of horse OCD/OA, in particular in the progression of the disease, and that chondrocytes undergo apoptosis via caspase 3. Concerning the use of horse OCD fragments as source of chondrocytes for ACT, these preliminary data indicate that there was apoptosis, but not all cells were dead and some chondrocytes could preserve a proliferative activity.

Keywords: Horse, osteochondrosis, OCD, apoptosis, caspase 3

PARAMETRI EMATICI, SALIVARI E RILIEVI ISTOLOGICI QUALI INDICI DI TRATTAMENTO INDOTTO CON DESAMETASONE NEL VITELLO DA CARNE

Cabassi Enrico ⁽¹⁾, Miduri Francesca ⁽¹⁾, Marin Anna ⁽²⁾, Cantoni Anna Maria ⁽¹⁾, Di Lecce Rosanna ⁽¹⁾, Corradi Attilio ⁽¹⁾

⁽¹⁾Dip. di Salute Animale, Università degli Studi di Parma. ⁽²⁾IZSVE, Legnaro (PD).

La ricerca e lo studio di tecniche rivelatrici di impropri trattamenti farmacologici negli animali allevati in produzione zootecnica, stanno assumendo notevole importanza sia nell'attuazione del Piano Nazionale Residui sia nella prevenzione e nel controllo dell'uso di ormoni in zootecnia. Nonostante precise norme vietino l'utilizzo di glucocorticoidi a scopo auxinico in questi animali, recenti segnalazioni indicano che il loro uso è ancora largamente diffuso, con non poche preoccupazioni da parte delle autorità sanitarie e dell'opinione pubblica. In tale contesto, risulta quindi pressante l'esigenza di individuare nuovi metodi diagnostici, rapidi ed attendibili, che consentano l'evidenziazione di animali trattati illecitamente. Obiettivo del presente lavoro è quello di valutare se un trattamento con desametasone a basso dosaggio (0,5 mg/capo/die), in vitelli da carne, per 30 giorni durante la fase di finissaggio, in rapporto a soggetti controllo, possa determinare variazioni significative sul contenuto di cortisolo salivare e sierico, modificazioni dei parametri emocromocitometrici e delle cellule effettrici/regolatrici della risposta immunitaria nonché alterazioni nell'assetto istopatologico di alcuni organi bersaglio, quali timo, tiroide e surrenali. Le risultanze conseguite hanno evidenziato negli animali trattati, quadri di iperglicemia, iperzinchemia, neutrofilia e riduzione significativa della componente linfocitaria citotossica (CD8+) e dei linfociti B (CD21) associati a quote di cortisolo salivare e sierico inferiori al limite di sensibilità strumentale (5,5 nmol/l). Sul piano istopatologico, vengono registrati quadri di linfopenia timica e di ipotrofia della zona fascicolata surrenalica, associati alla presenza di macrofollicoli a carico della tiroide.

Parole chiave: sangue, saliva, linfociti, desametasone, vitelli

HAEMATOLOGICAL, SALIVARY PARAMETERS AND HISTOLOGICAL OBSERVATIONS AS INDEXES OF DEXAMETHASONE TREATMENT IN CALVES

The AA underline the importance of saliva and blood to detect pharmacologic illicit treatment in calves. In particular, they study the modifications of haematic and salivary cortisol, the modifications of T/B lymphocyte sub-populations and haematological parameters and morphostructural alterations of target organs (thymus, thyroid and adrenal glands), in calves fed daily with a diet containing 0,5 mg/calf of dexamethasone, for 30 days during the finishing period, in comparison to control ones. In treated animals, results demonstrate increased values of Zn ion and glycemia, neutrophilia, a decrease of CD8+ and CD21 T/B-lymphocytes and a decrement of haematic/salivary cortisol levels, below the instrumental sensibility limits. Thymic lymphopenia and cortical adrenal hypotrophy, associated with thyroid macrofolliculi, are also recorded. These findings show that blood/salivary cortisol levels as well as haematological/histological parameters might be considered a reliable diagnostic parameters in the identification of glucocorticoids treated animals.

Keywords: blood, saliva, lymphocytes, dexamethasone, calves

ENCEFALITOOZONOSI (*ENCEPHALITOOZON CUNICULI*) IN CONIGLI MACELLATI DELLA ROMAGNA E DEL VENETO: QUADRI ANATOMOISTOPATOLOGICI ED ULTRAISTRUTTURALI

Militerno Gianfranco¹, Morandi Federico¹, Taffetani Luca³, Trevisani Marcello²,
Marcato Paolo Stefano¹

Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale –
Facoltà di Medicina Veterinaria – Alma Mater Studiorum, Università di Bologna
¹Servizio di Anatomia Patologica. ²Servizio di Igiene e Tecnologie Alimentari
³ Unità Operativa Igiene Alimenti di O.A. - AUSL Forlì

Dall'esame *post-mortem* di conigli allevati e macellati in Romagna e Veneto sono emersi quadri infiammatori renali di sospetta origine infettiva. 54 reni, appartenenti a 27 soggetti, mostravano lesioni di nefrite interstiziale acuta multifocale (26), acuta a focolai chiari sparsi (16), sub-acuta (6) e cronica con focolai retratti (6), rispettivamente classificate in 4 stadi (sI, sII, sIII, sIV). Tutti i reni e l'encefalo di 4 conigli con lesioni renali sI, sII, sIII sono stati sottoposti ad indagine istologica.

L'esame microscopico confermava i quadri di nefrite tubulo-interstiziale con dilatazione/degenerazione dei tubuli e vari gradi di fibrosi. Accanto ai focolai, il metodo di Gram ed il blu di toluidina su sezioni semifini evidenziavano spore di microsporidi all'interno di vacuoli intracitoplasmatici.

In particolare, le spore erano visibili in cellule di tubuli della midollare di reni con lesioni sI (1,85% di 54) ed sII (7,4 % di 54), nessuna in reni con lesioni sIII ed sIV. Focolai granulomatosi e di peri-vasculite apparivano in sezioni di SNC, mentre nel tratto bulbo-pontino di un caso si rilevava una vescicola contenente spore.

L'indagine ultrastrutturale evidenziava nei vacuoli *Encephalitozoon cuniculi* in diversi stadi di sviluppo: meronte, sporonte, sporoblasto (lungo 2 µm con sezioni trasversali del tubo polare) e spore mature elettrondense. Tali osservazioni indicano la presenza di *Encephalitozoon cuniculi* in reni con lesioni sI, sII e talvolta in sezioni encefaliche di soggetti con lesioni renali sI/sIII.

E. cuniculi causa l'encefalitozoonosi, importante zoonosi soprattutto in individui immunodepressi e già segnalata anche in conigli da compagnia.

Parole chiave: encefalitozoonosi, *Encephalitozoon cuniculi*, rene, nefrite, coniglio

INTRODUZIONE

Dall'esame *post-mortem* di conigli allevati e macellati in Romagna e Veneto sono emersi quadri infiammatori renali di sospetta origine infettiva. 54 reni, appartenenti a 27 soggetti, sono pervenuti fissati in formalina presso il Servizio di Anatomia Patologica della Facoltà di Medicina Veterinaria di Bologna per indagini microscopiche.

8 reni di 4 conigli erano accompagnati dai rispettivi encefali. I quadri macroscopici osservati al macello e da confermare erano compatibili con microsporidiosi da *Encephalitozoon cuniculi*, parassita intracellulare obbligato, correlato secondo studi filogenetici ai miceti (5, 10, 11).

MATERIALI E METODI

Nel periodo marzo-novembre 2005 sono stati ispezionati 24.226 conigli provenienti da 57 allevamenti situati in Emilia Romagna e Veneto e regolarmente macellati in quattro macelli della provincia di Forlì-Cesena. I conigli all'esame *ante-mortem* non avevano mostrato alcun segno clinico di malattia e, sulla base dei dati rilevabili dal certificato sanitario, non avevano mostrato variazioni della mortalità/morbilità. Le osservazioni effettuate in sede di macellazione avevano evidenziato lesioni renali infiammatorie di presunta origine infettiva. Dall'esame dei 54 reni campionati erano emerse lesioni multifocali iperemiche puntiformi giudicate come aspetti di nefrite interstiziale acuta multifocale in 26 reni, lesioni piatte a focolai chiari sparsi in 16 (Fig. 1), lesioni depresse

sparse in 6 e multifocali retratte in altri 6 reni ed attribuite rispettivamente a quadri di nefrite sub-acuta e cronica. Tali lesioni sono state classificate in 4 stadi (sI, sII, sIII, sIV, Tabella 1). Tutti i reni e l'encefalo di 4 conigli con lesioni renali sI, sII, sIII sono stati sottoposti ad indagine istologica ed ultrastrutturale. Gli organi sono stati processati per ottenere sezioni di 5µ da colorare con ematossilina-eosina (E&E) e metodo di Gram. Per la microscopia elettronica a trasmissione (ME), campioni di tessuto renale fissati in formalina sono stati sottoposti a post-fissazione in tetrossido di osmio (1%), diluito (0,1M) con tampone cacodilato (pH 7,2-7,4), ed inclusi in araldite. Sezioni semifini sono state colorate con blu di toluidina, mentre sezioni ultrafini sono state sottoposte a doppia colorazione con acetato di uranile e citrato di piombo e poi osservate con microscopio elettronico Zeiss EM 109.

RISULTATI

L'esame istologico permetteva di confermare i quadri infiammatori renali sospettati macroscopicamente, evidenziando vari stadi di nefrite interstiziale linfo-plasmocitaria a focolai, fibrosi progressivamente più intensa in reni con lesioni da sII a sIV, dilatazione dei tubuli renali cortico-midollari, aspetti degenerativi tubulari. Foci iperemici erano presenti in reni con lesioni sI, mentre intensa fibrosi retraente in seno a focolai granulomatosi ed interstiziali era visibile in sIV, soprattutto in aree paracorticali sub-capsulari. In alcuni campi era possibile osservare vacuoli parassitofori intracitoplasmatici (pseudocisti) in cellule dei tubuli cortico-midollari o della midollare propriamente detta, dove si notavano con difficoltà strutture di pochi µm debolmente eosinofile. Accanto ai focolai, od al centro di essi, il metodo di Gram (Fig. 2) ed il blu di toluidina su sezioni semifini (Fig. 3) evidenziavano spore di microsporidi all'interno dei vacuoli. In particolare, le spore Gram-positive erano visibili in 1 rene con lesioni sI (3,8% su 26 sI, 1,85% su 54 reni) ed in 4 con lesioni sII (25% su 16 sII, 7,4% su 54 reni), nessuna in reni con lesioni sIII ed sIV. Focolai granulomatosi e di perivasculite apparivano in sezioni di SNC, mentre nel tratto bulbo-

pontino di un caso, che mostrava aspetti di nefrite sia sI e sia sIII, si rilevava una vescicola contenente spore (Fig. 4).

L'indagine ultrastrutturale (Fig. 5) evidenziava nei vacuoli *Encephalitozoon cuniculi* in diversi stadi di sviluppo: meronte, sporonte, sporoblasto (lungo circa 2 µm con sezioni trasversali del tubo polare spiraliforme), spore mature elettrondense di 1,5 x 2,5 µm con esospora proteinacea (parete esterna) ed endospora chitinosa (10).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Le osservazioni riportate indicano la presenza di *Encephalitozoon cuniculi* in reni (9,25% dei reni esaminati) con lesioni sI, sII e talvolta in sezioni encefaliche di soggetti con lesioni renali sI/sIII. Le lesioni encefaliche sono risultate in prevalenza aspecifiche, come riportato in letteratura, e caratterizzate da aspetti focali granulomatosi (originati probabilmente da rottura di vacuoli parassitofori), astrogliosi o perivasculiti linfoplasmocitarie multifocali (2, 4, 10). Accanto a tali lesioni, nella casistica esaminata, solo un caso ha mostrato l'evidenza eziologica attribuita ad *E. cuniculi*. La coesistenza di lesioni acute (sI) e sub-acute (sIII) in reni di coniglio con spore identificate anche in sezioni encefaliche potrebbe essere interpretata come reinfezione con riacutizzazione infiammatoria in rene con lesioni in via di cronicizzazione (da infestazione precoce). Ulteriori indagini sono necessarie per confermare se anche in altri stadi evolutivi della malattia sia possibile evidenziare spore. L'identificazione di *E. cuniculi* è stata possibile grazie all'impiego di metodi istochimici in grado di differenziarlo anche da *Toxoplasma gondii* che, oltre ad essere Gram-negativo, ha una più bassa incidenza d'infezione e non possiede filamento polare ("polar tube") (1, 2, 7, 8, 9, 10). La tipizzazione di *E. cuniculi*, resa agevole con metodiche immunoistochimiche, non impiegate per la diagnosi dei casi segnalati, è stata effettuata con la microscopia elettronica che ha rivelato il parassita a diversi stadi di sviluppo (3, 6, 10, 11).

E. cuniculi è causa di una patologia cronica del coniglio, generalmente in forma asintomatica ed occasionalmente con manifestazioni

cliniche neurologiche caratterizzate da nistagmo, torcicollo, opistotono, rigidità muscolare, incapacità di deglutire, incoordinazione e paralisi motoria delle estremità posteriori. Tale sintomatologia è presente anche in forme causate da altri patogeni (*Pasteurella multocida*, *Toxoplasma gondii*) (2).

E. cuniculi è un microsporidio (*phylum Microspora*), parassita intracellulare obbligato che tipicamente forma spore contenenti un caratteristico filamento polare avvolto a spirale (5, 10, 11).

Grazie a tale struttura *E. cuniculi* può iniettare il proprio sporoplasma nella cellula ospite (epiteliale, macrofagica, endoteliale), con meccanismo verosimilmente innescato da un'improvvisa variazione della pressione osmotica, conseguente all'idrolisi di riserve energetiche, immagazzinate sotto forma di molecole di trialosio. L'evoluzione successiva prevede la presenza di forme proliferative (meronti) da cui prenderà avvio la fase sporogonica (10). L'intero ciclo vitale accade in uno stesso ospite, ma la spora può proliferare anche in altri mammiferi, uomo compreso. L'infestione è trasmessa generalmente in modo orizzontale, tramite ingestione di spore presenti in alimenti ed acqua contaminati o per inalazione, ma è stata documentata anche una trasmissione intrauterina. La moltiplicazione avviene in rene e sistema nervoso centrale, mentre l'eliminazione avviene con l'emissione delle spore con le urine (10).

I rilievi diagnostici riportati sono importanti perché segnalati in soggetti da carne, regolarmente macellati per il consumo umano. La percentuale di positività riscontrata e le correlazioni macro/microscopiche destano qualche preoccupazione a causa di una possibile più ampia contaminazione ambientale degli allevamenti e di un più ampio coinvolgimento di conigli positivi asintomatici o con lesioni non evidenti. Ulteriori studi e controlli sono necessari poiché *E. cuniculi* causa l'encefalitozoonosi, malattia segnalata anche in conigli da compagnia e zoonosi

importante soprattutto in soggetti immunodepressi (HIV-positivi, pazienti defedati o trattati con antiblastici e/o cortisonici) (3, 4, 6, 10, 11).

BIBLIOGRAFIA

1. Bjerckås I. e Landsverk T. (1986): Identification of *Toxoplasma gondii* and *Encephalitozoon cuniculi* by immunoperoxidase techniques and electron microscopy, in stored, formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. Acta Vet. Scand., 27, 11-22.
2. Finazzi M., Gallazzi D., Loglio G., Scanziani E. (1983): Contributo allo studio di alcune encefalopatie del coniglio domestico ed in particolare della encefalitozoonosi. Riv. Zoot. Vet., 11, 354-362.
3. Giordano C., Weight A., Vercelli A., Rondena M., Grilli G., Giudice C. (2005): Immunohistochemical identification of *Encephalitozoon cuniculi* in phacoclastic uveitis in four rabbits. Vet. Ophthalm., 8, 271-275.
4. Harcourt-Brown F.M. e Holloway H.K. (2003): *Encephalitozoon cuniculi* in pet rabbits. Vet. Rec., 152, 427-431.
5. Mathis A., Weber R., Deplazes P. (2005): Zoonotic Potential of the Microsporidia. Clin. Microbiol. Rev., 18, 423-445.
6. Mo L. e Drancourt M. (2004): Monoclonal Antibodies for Specific Detection of *Encephalitozoon cuniculi*. Clin. Diagn. Lab. Immun., 11, 1060-1063.
7. Scanziani E., Gallazzi D., Finazzi M., Mandelli G. (1982): Contributo allo studio delle nefropatie infiammatorie del coniglio domestico. Riv. Zoot. Vet., 10, 205-214.
8. Scanziani E., Finazzi M., Gallazzi D. (1985): Identificazione istologica di *Encephalitozoon cuniculi* e *Toxoplasma gondii*. Riv. Zoot. Vet., 13, 21-27.
9. Shaddock J.A. e Pakes S.P. (1971): Encephalitozoonosis (Nosematosis) and Toxoplasmosis. Am. J. Pathol., 64, 657-674.
10. Wasson K. e Peper R. (2000): Mammalian Microsporidiosis. Vet. Pathol., 37, 113-128.
11. Xu Y. e Weiss L.M. (2005): The microsporidian polar tube: A highly specialised invasion organelle. Intern. J. Parasit., 35, 941-953.

STADIO	DESCRIZIONE MACROSCOPICA	DIAGNOSI
I	Reni chiari con lesioni multifocali iperemiche e puntiformi. Lieve aumento di volume	Nefrite interstiziale acuta multifocale
II	Reni con focolai chiari sparsi, visibili anche in sezione. Aumento di volume incostante	Nefrite interstiziale acuta a focolai chiari sparsi
III	Reni di colore normale con rari focolai chiari e focolai superficiali di lieve retrazione fibrosa. Aumento di volume incostante	Nefrite interstiziale subacuta
IV	Reni di colore normale ed aspetti multifocali di imponente retrazione fibrosa.	Nefrite interstiziale cronica con focolai retratti

Tabella 1. Quadri di nefrite riscontrati all'esame *post-mortem*



Figura 1. Reni con nefrite interstiziale acuta a focolai chiari sparsi (sII).

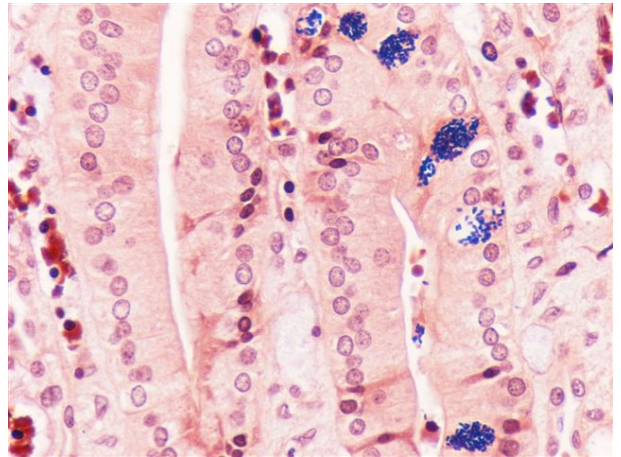


Figura 2. Rene. Spore Gram-positive di *E. cuniculi* in vacuoli intracitoplasmatici di cellule dei tubuli. Gram. Ob. 40X.

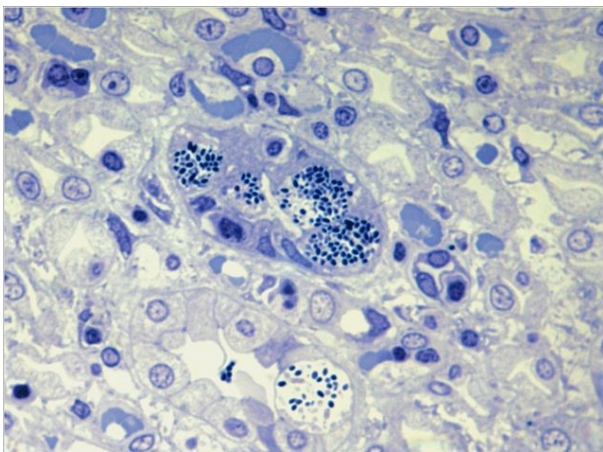


Figura 3. Rene. Spore di *E. cuniculi* in cellule dei tubuli. Blu di toluidina, semifine. Ob. 63X.

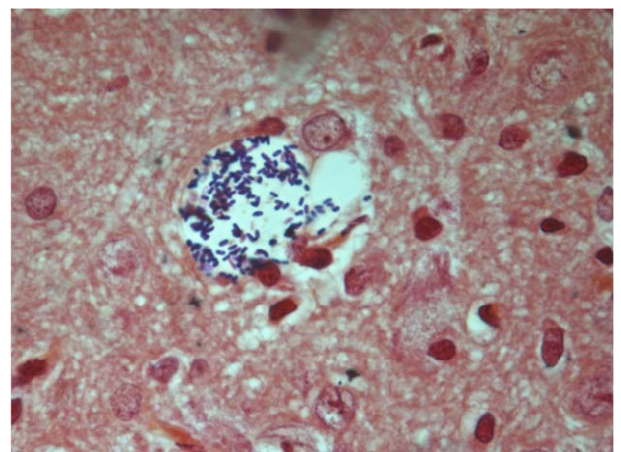


Figura 4. Encefalo. Vacuolo parassitoforo con spore di *E. cuniculi* Gram-positive. Gram. Ob. 63X.



Figura 5. Rene. Vacuolo contenente *E. cuniculi* in diversi stadi di sviluppo. In basso al centro lo sporoblasto mostra sezioni trasversali del tubo polare. Le spore mature sono elettrondense ed hanno doppia parete. ME. Bar, 2 μ m.

GROSS, HISTOPATHOLOGICAL AND ULTRASTRUCTURAL FEATURES OF ENCEPHALITOOZONOSIS (*ENCEPHALITOOZON CUNICULI*) IN SLAUGHTERED RABBITS OF ROMAGNA AND VENETO

Post-mortem examination of rabbits bred and slaughtered in Romagna and Veneto showed renal inflammatory lesions of presumptive infectious origin. Gross examination of 54 kidneys from 27 rabbits revealed acute multifocal interstitial nephritis (26), acute focal pale and scattered nephritis (12), sub-acute (6) and chronic nephritis with depressed areas (6), respectively classified in 4 stages (sI, sII, sIII, sIV). The 54 kidneys and brains from 4 rabbits with sI, sII, sIII nephritis were histologically examined.

Microscopical examination confirmed all the stages of lymphocytic-plasmacytic interstitial nephritis with dilation and degenerative changes of renal tubules and variable amounts of fibrosis. Near inflammatory foci, Gram stain and semifine toluidine-blue stained sections demonstrated the presence of microsporidial spores inside of intracytoplasmic vacuoles. In particular, spores were present in medullary tubular cells of kidneys with sI (1,85% of 54) and sII (7,4 % of 54) lesions, but were not detected in sIII and sIV. Focal perivascular cuffs and granulomas were observed in CNS and, in one case, a vacuole containing spores was detected in bulbopontine area. Ultrastructural examination showed *Encephalitozoon cuniculi* within vacuoles at different stages of development: sporont, sporoblast (2 μ m length with cross sections of the coiled polar tube) and electron-dense mature spores. These results demonstrate the presence of *Encephalitozoon cuniculi* in sI, sII renal lesions and sometimes in brain sections of rabbits with sI/sIII nephritis.

E. cuniculi causes encephalitozoonosis, an important zoonosis especially for humans with immunodeficiency, already reported in pet rabbits.

Keywords: encephalitozoonosis, *Encephalitozoon cuniculi*, kidney, nephritis, rabbit

INDAGINI CITOFLUORIMETRICHE, SIEROLOGICHE E DETERMINAZIONE DI CITOCHINE IN SUINI VACCINATI CONTRO LA MALATTIA DI AUJESZKY

Ferrari Luca⁽¹⁾, De Angelis Elena⁽¹⁾, Corradi Attilio⁽¹⁾, Saleri Roberta⁽²⁾, Cavalli Valeria⁽²⁾, Smeets Jos⁽³⁾, Blanchaert André⁽⁴⁾, Gozio Stefano⁽³⁾, Martelli Paolo⁽¹⁾, Borghetti Paolo⁽¹⁾.

⁽¹⁾Dip. di Salute Animale, Università degli Studi di Parma; ⁽²⁾Dip. di Produzioni Animali, Biotecnologie Veterinarie, Qualità e Sicurezza degli Alimenti, Università degli Studi di Parma; ⁽³⁾Intervet International, Boxmeer, The Netherlands; ⁽⁴⁾Intervet Italia, Milano.

L'immunità specifica è stata valutata in suini di un allevamento convenzionale vaccinati per via intradermica contro il virus della Malattia di Aujeszky (ADV). 10 animali sono stati vaccinati a 60 giorni di età e dopo 4 settimane (88 giorni) e sottoposti a prelievo di sangue in litio-eparina al momento della prima somministrazione e successivamente dopo 2, 4, 5, 6, 7 settimane. Per valutare la risposta cellulo-mediata sono stati determinati i livelli di cellule secernenti IFN- γ ADV-specifiche mediante saggio ELISpot ed i cambiamenti dei livelli delle sottopopolazioni di linfociti nel sangue periferico mediante citofluorimetria. I livelli di espressione di IFN- γ nei leucociti mononucleati sono stati determinati mediante Real Time PCR; la risposta umorale è stata valutata mediante saggio di virus neutralizzazione (VN). La risposta IFN- γ -mediata ADV-specifica ha evidenziato un incremento dopo la prima vaccinazione ed il raggiungimento di valori oltre due volte superiori dopo la seconda vaccinazione. I livelli di espressione di IFN- γ sono aumentati in modo sensibile ed uniforme tra gli animali dopo la seconda vaccinazione. Si è inoltre evidenziato un incremento dei livelli di cellule CD4+CD25+ e CD4-CD25+ (linfociti T attivati) dopo la seconda vaccinazione ed elevati livelli di cellule CD8 β + (linfociti T citotossici) per tutto il periodo di osservazione. I livelli di anticorpi neutralizzanti, aumentati già dopo la prima vaccinazione, hanno manifestato un effetto *booster* dopo la seconda vaccinazione. Tale studio ha permesso di caratterizzare parametri immunitari fondamentali la cui utilizzazione in campo rappresenta un utile metodo di valutazione della risposta immunitaria in termini di attivazione e di efficienza protettiva che può trovare applicazione nello studio di nuove modalità di vaccinazione e di formule vaccinali innovative.

Parole chiave: suino, vaccinazione, malattia di Aujeszky, IFN- γ , immunità specifica

FLOW CYTOMETRIC, SEROLOGICAL INVESTIGATIONS AND CYTOKINE DETERMINATION IN PIGS VACCINATED AGAINST AUJESZKY'S DISEASE

Specific immunity has been evaluated in pigs intradermally vaccinated against Aujeszky's Disease Virus (ADV) in a conventional herd. 10 animals were vaccinated at 60 days of age and 4 weeks apart (88 days); samples were collected at the 1st administration and 2, 4, 5, 6, 7 weeks post-vaccination. To evaluate the cell-mediated immune response, the levels of ADV-specific IFN- γ secreting cells were determined by an ELISpot assay and the changes of lymphocyte subpopulations in peripheral blood by flow cytometry. IFN- γ expression levels in mononuclear leucocytes were determined by Real Time PCR; humoral immune response was evaluated by a virus neutralization (VN) assay. ADV-specific IFN- γ response showed an increase after the 1st vaccination; 2-fold higher values have been detected after the 2nd vaccination. IFN- γ expression levels showed the same high increase in all the animals after the 2nd vaccination. Indeed an increase of CD4+CD25+ and CD4-CD25+ cells (activated T lymphocytes) after the 2nd vaccination and high levels of CD8 β + cells (cytotoxic T lymphocytes) during the whole analysis period were evident. The levels of neutralizing antibodies increased after the 1st vaccination and boosted after the 2nd injection. This study allowed to characterize fundamental immune parameters whose employment on field conditions represents a useful method to analyse the immune response in terms of activation and protection, particularly to investigate new routes of vaccine administration and innovative vaccines.

Key words: pig, vaccination, Aujeszky's Disease, IFN- γ , specific immunity

FIBRODISPLASIA OSSIFICANTE PROGRESSIVA (FOP) IN UN GATTO

¹Sforna Monica; ¹Capuccini Silvia; ²Gallorini Francesco; ¹Brachelente Chiara; ¹Lepri Elvio

¹Dipartimento di Scienze Biopatologiche ed Igiene delle Produzioni Animali ed Alimentari –
Università degli Studi di Perugia. ²DVM

La fibrodiplosia ossificante progressiva (FOP) rappresenta una rara malattia ereditaria del tessuto connettivo nell'uomo per il quale si verifica una graduale e parziale sostituzione dei tessuti connettivi e muscolari da parte di tessuto osseo neoformato. Anche se il difetto genetico responsabile della FOP non è ancora noto, diversi studi indicano che la BMP4 (Bone Morphogenetic Protein 4) possa essere coinvolta nel meccanismo eziopatogenetico. Negli animali domestici la fibrodiplosia ossificante è stata segnalata, sia in forma isolata che generalizzata, nel cane, nel gatto e nel suino. Il caso descritto si riferisce ad un gatto, maschio, comune europeo di 3 anni, portato a visita per una marcata rigidità nella deambulazione associata a dolorabilità e riluttanza al salto. L'anamnesi non riferiva di traumi pregressi. La visita clinica ha escluso la presenza di un deficit neurologico. Il profilo biochimico ha messo in evidenza un aumento della CPK e del Ca sierico ed il test FIV/FeLV è risultato negativo. L'esame radiologico ha mostrato la presenza numerosi foci di mineralizzazione a carico dei tessuti molli, in particolare delle porzioni prossimali degli arti e del dorso dell'animale. L'esame anatomopatologico ha evidenziato la presenza di formazioni multiple, di dimensioni variabili, di colore bianco-grigiastro, di consistenza dura all'interno di diverse masse muscolari con prevalente coinvolgimento bilaterale simmetrico dei mm. lunghissimo del dorso, semitendinoso e sottoscapolare. L'esame istopatologico ha confermato la presenza di tessuto osseo normoconformato, a vari gradi di maturazione, con produzione di midollo osseo limitata ad alcune aree associate ad un'intensa proliferazione fibrovascolare e ad eventi degenerativi del tessuto muscolare circostante. In medicina umana l'eziopatogenesi della FOP è stata correlata ad una alterata regolazione della BMP4 da parte delle fibrocellule muscolari. La stessa molecola appare overespressa dai linfociti che caratterizzano le fasi iniziali della FOP. Ulteriori studi sarebbero necessari per valutare la possibilità che la rara forma di FOP segnalata nel gatto condivida con la malattia dell'uomo, oltre che gli aspetti clinici ed anatomoistopatologici, anche i meccanismi eziopatogenetici.

Parole chiave: gatto, fibrodiplosia ossificante, osso

FIBRODYSPLASIA OSSIFICANS PROGRESSIVA (FOP) IN A CAT

FOP is a autosomal dominantly inherited connective tissue disease in human characterized by progressive postnatal heterotopic ossification. The genetic defects of FOP are not known but different animal model are in use to study the physiopathology of the disease. We describe a case of FOP in a 3 years old, male, domestic short-haired cat. At the physical examination the cat showed altered gait, stiffness especially of the hind limbs and it was reluctant to jump. The owner didn't referred a history of previous trauma. No neurologic deficits were present. Radiographic examination demonstrate the presence of multifocal areas of mineralization localized to the thighbones regions, to the shoulders and the back. Gross examination revealed more disseminated foci of tissue proliferation, ranging in colour from grey to brown, and variable in size and consistency. In the thoracic cavity an adherence between the right lung basal lobe and the parietal pleura was present. Histopathology confirmed the bony origin of the new formed tissue associated with bone marrow production and areas of intense fibroblastic reaction.

Keywords: cat, fibrodiplosia ossificans, bone

ESPRESSIONE NELLA GHIANDOLA MAMMARIA BOVINA E NEL LATTE DI UNA ISOFORMA DELLA α_1 -GLICOPROTEINA ACIDA (AGP)

Miranda Ribera Alba, Pocacqua Vanessa, Avallone Giancarlo, Sartorelli Paola, Fortin Riccardo, Lecchi Cristina, Rebucci Raffaella, Scaccabarozzi Licia, Ceciliani Fabrizio

Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria (DIPAV), Via Celoria 10, 20133 Milano

L' α_1 -glicoproteina acida è una proteina ad attività immunomodulatoria, espressa dagli epatociti come conseguenza della risposta sistemica della infiammazione. Poiché il nostro gruppo ha recentemente scoperto nel latte la presenza della boAGP, la nostra attenzione si è concentrata sull'epitelio ghiandolare mammario al fine di ottenere informazioni sull'espressione locale di boAGP come punto di partenza per studiare i suoi effetti locali durante le infiammazioni che colpiscono la ghiandola mammaria. Con questo progetto abbiamo indagato se l'isoforma della boAGP presente nel latte deriva dalle cellule della ghiandola mammaria, oppure se si tratta della isoforma epatica presente nel plasma che viene trasferita dal sangue al latte. Questo lavoro si è articolato in varie fasi.

a) caratterizzazione strutturale della isoforma da latte eseguita mediante sequenziamento del cDNA ottenuto da cellule della ghiandola mammaria.

b) studi di espressione sia del gene (RT-PCR) che della proteina matura (immunoistochimica).

La struttura primaria della isoforma epatica e di quella mammaria sono identiche contrariamente al pattern elettroforetico che appare differente. Si può quindi ipotizzare che sia presente un solo gene che codifica per la proteina e che le differenze osservate siano dovute a modificazioni post-traduzionali.

Mediante l'immunoistochimica, nei tessuti l'espressione dell'AGP è stata evidenziata esclusivamente a carico del citoplasma delle cellule epiteliali. L'epitelio della cisterna e del capezzolo erano caratterizzati da positività diffusa ed intensa rispetto a tutte le altre aree mammarie. Gli alveoli in fase di secrezione mostravano positività meno intensa e prevalentemente apicale, mentre i gruppi di alveoli con ridotta attività secretiva o a riposo esibivano positività intensa e diffusa.

In tutte le aree della ghiandola mammaria è stata evidenziata l'espressione del gene dell'AGP mediante RT-PCR.

Parole chiave: α_1 -glicoproteina acida (AGP), ghiandola mammaria, latte

INTRODUZIONE

L' α_1 -glicoproteina acida è una proteina di fase acuta appartenente alla famiglia delle immunoglobuline, un gruppo di proteine che associano ad una attività di tipo immunomodulatorio anche una funzione di trasporto di piccole molecole idrofobiche (Hocheppied et al, 2004). Il peso molecolare della AGP è di 44 kDA, più del 40% dei quali costituito da gruppi oligosaccaridici (Ceciliani et al, 2006). Come tutte le proteine di fase acuta, anche la AGP viene espressa dagli epatociti come conseguenza della risposta sistemica della infiammazione. Poiché il nostro gruppo ha recentemente scoperto nel latte la presenza della boAGP, la nostra attenzione si è concentrata sull'epitelio ghiandolare mammario al fine di ottenere informazioni sull'espressione locale di boAGP come punto

di partenza per studiare i suoi effetti locali durante le infiammazioni che colpiscono la ghiandola mammaria.

Il progetto si propone almeno due obiettivi. Da una parte interessa ottenere informazioni più dettagliate sulla presenza di boAGP a livello di ghiandola mammaria. Queste informazioni sono utili per studiare gli effetti locali della proteina durante le mastiti. Un obiettivo ulteriore è indagare se l'isoforma della boAGP presente nel latte deriva dalle cellule della ghiandola mammaria oppure se si tratta della isoforma epatica presente nel plasma che viene trasferita dal sangue al latte

L'esperimento è stato quindi disegnato in varie fasi. La localizzazione è stata eseguita mediante tecniche di immunostochimica (proteina) e RT-PCR (mRNA codificante boAGP).

Parallelamente è stata determinata la struttura primaria della isoforma mammaria mediante sequenziamento del cDNA. Infine si è eseguita una caratterizzazione delle modificazioni post-traduzionali mediante tecniche di proteomica.

MATERIALI E METODI

La boAGP da plasma e da latte è stata purificata secondo il protocollo precedentemente messo a punto nel nostro laboratorio (Cecilianì et al., 2005). La caratterizzazione strutturale è stata eseguita mediante SDS-PAGE ed elettroforesi bidimensionali, utilizzando un gradiente lineare di pH di 3-6. L'elettrotrasferimento è stato eseguito utilizzando tecniche convenzionali di Western Blotting. La immunocolorazione è stata eseguita utilizzando un anticorpo policlonale (poly anti-boAGP).

Lo stesso anticorpo è stato utilizzato per gli studi di espressione della proteina matura mediante tecniche di immunistochemica, eseguite su sezioni criostatiche, utilizzando come cromogeno AEC e controcolorante con emalume, a livello di diverse sezioni di ghiandola mammaria. In particolare sono state campionate sezioni provenienti dall'epitelio secernente della ghiandola mucosa, dalla mucosa della cisterna del latte e del capezzolo. Parallelamente sono stati eseguiti studi di espressione del gene della boAGP mediante RT-PCR. Le tecniche di clonaggio e sequenziamento utilizzate per la determinazione della sequenza del gene estratto dalla ghiandola mammaria sono già state precedentemente descritte (Cecilianì et al., 2005).

RISULTATI

La figura 1 illustra come sia presente mRNA codificante per boAGP a livello di epitelio secernente della ghiandola mammaria.

La figura 2 illustra i risultati della caratterizzazione strutturale, che si è concentrata principalmente sullo studio mediante immunocolorazione delle due isoforme, plasmatica e mammaria. Dal punto di vista strutturale le proteine appaiono diverse. Il peso molecolare della isoforma

mammaria (lane A) è più alto di circa 2 kDa rispetto alla isoforma plasmatica (lane B). Sono apprezzabili alcune glicoforiche con un peso molecolare di circa 60 kDa assenti nella isoforma plasmatica. L'isoforma plasmatica assume la tendenza a dimerizzare, come si può apprezzare dalla banda identificata. Queste differenze si possono evidenziare anche nell'elettroforesi bidimensionale. Si possono inoltre identificare nella isoforma mammaria alcune proteine a basso peso molecolare che probabilmente sono dovute a fenomeni di deglicosilazione o a parziale glicosilazione.

Nella isoforma plasmatica si evidenziano invece glicoforiche ad alto punto isoelettrico, che possono essere dovute a isoforme parzialmente desialilate. Parallelamente agli studi di caratterizzazione strutturale, è stato eseguito anche un sequenziamento del cDNA codificante per la proteina estratta dalla ghiandola mammaria. Allo stato attuale sono disponibili unicamente risultati parziali, che comunque suggeriscono che la sequenza della isoforma da latte è identica a quella epatica presente nel plasma.

La localizzazione del gene e della proteina sono state seguite mediante tecniche di RT-PCR ed immunistochemica. Per quello che riguarda la localizzazione della proteina, i risultati degli esperimenti sono stati presentati nella figura 3. In particolare nei tessuti l'espressione della boAGP è stata evidenziata esclusivamente a carico del citoplasma delle cellule epiteliali con intensità differente nei vari distretti anatomici, come indicato nella figura 3. In particolare,

Gli alveoli con ridotta attività secretiva esibiscono una positività intensa e diffusa (figura 3 A); al contrario, gli alveoli in fase di secrezione dimostrano una positività meno diffusa, e prevalentemente apicale (figura 3 B). Una positività intensa e diffusa si può apprezzare anche lungo l'epitelio della cisterna del latte (figura 3 C indicata dalle frecce) e della mucosa del capezzolo (figura 3 D). Nella figura 4 sono invece presentati i risultati degli studi di espressione mediante RT-PCR. Benché non sia stata eseguita una valutazione di tipo quantitativo, è possibile evidenziare come alla espressione della proteina corrisponda anche la espressione del mRNA che la produce.

Questi dati nel complesso confermano che la proteina viene prodotta dall'epitelio secernente

della ghiandola mammaria, e che viene espressa insieme alle altre proteine nel latte.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'obiettivo che volevamo aggiungere con questo lavoro consisteva nella valutazione della espressione della boAGP nel latte: in modo articolare ci interessava studiare la origine della proteina. Un nostro lavoro precedente aveva dimostrato che la proteina veniva effettivamente espressa dall'epitelio della ghiandola mammaria e dalle cellule somatiche (Ceciliani et al, 2005). Con questi dati abbiamo confermato il risultato precedente, che è stato inoltre completato dai dati di immunolocalizzazione. Abbiamo inoltre dimostrato che le due proteine subiscono un processamento post-traduzionale completamente differente, a conferma della ipotesi che la boAGP viene probabilmente espressa da un unico gene, ma viene però processata in modo differente in relazione al tipo cellulare che la esprime. La maggior parte delle proteine di fase acuta sono state inizialmente identificate come proteine di produzione epatica, ma esiste una crescente evidenza che molte di queste proteine vengono espresse anche a livello locale. L'attività e la regolazione della espressione a livello locale possono essere anche molto differenti: per esempio l'albumina espressa dalla ghiandola mammaria è una proteina di fase acuta positiva, al contrario di quella espressa dal fegato che

risulta invece essere una proteina di fase acuta negativa.

Il significato biologico dei nostri dati risulta al momento ancora oscuro. E' sicuramente necessario un approfondimento più dettagliato per quello che riguarda la localizzazione, nonché per quello che riguarda le vie di controllo della espressione: dal momento che una delle attività principali della AGP è quella immunomodulatoria, risulterebbe interessante valutare per esempio se la espressione della proteina è correlata a particolari stadi di lattazione. Un altro aspetto interessante da valutare è rappresentato dalla differente attività delle isoforme. E' infatti evidente come nel latte possano esistere contemporaneamente almeno due isoforme, quella mammaria, espressa dall'epitelio della ghiandola, e quella plasmatica, che viene espressa dal fegato ma che può essere presente nel latte a seguito della formazione di essudato infiammatorio in corso di mastite. Saranno queste le tematiche che probabilmente verranno indagate nella fase successiva del lavoro.

BIBLIOGRAFIA

1. Ceciliani et al. (2005) Vet Res. Sep-Dec;36(5-6):735-746.
2. Ceciliani et al. (2006) Curr Prot Pep Science, in press
3. Hocheppied T., (2004) Cyt Growth Factors Review, 14, 23-34.

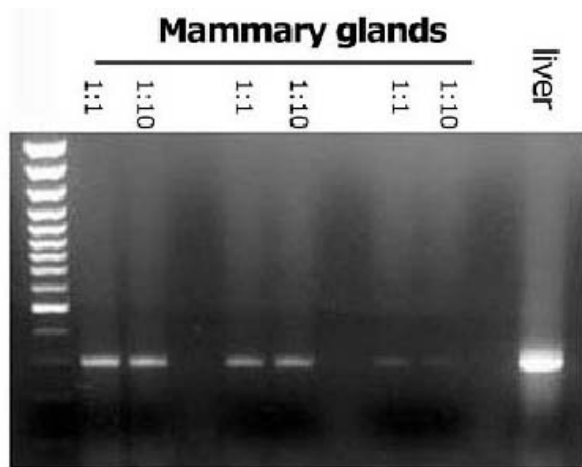


Figura 1. Espressione del mRNA dell'AGP bovina nel tessuto della ghiandola mammaria. Nelle sei lane sono state caricate differenti concentrazioni (1:1 ed 1:10) di cDNA derivato da ghiandole mammarie di 3 diversi animali. mRNA di fegato bovino è stato utilizzato come controllo positivo.

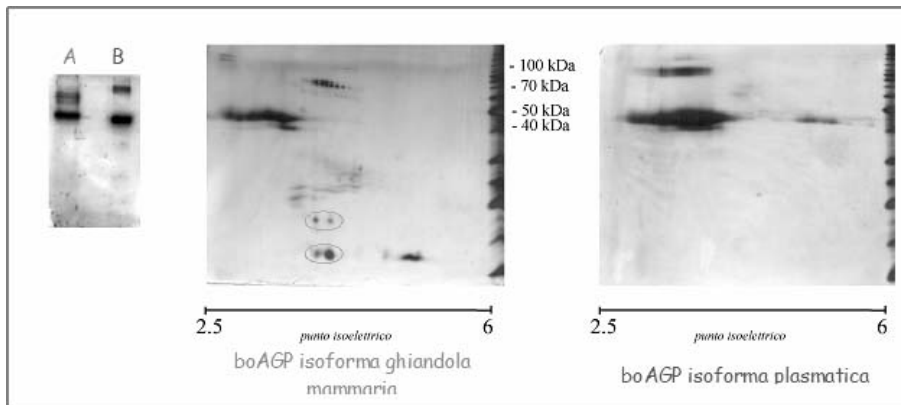


Figura 2. Caratterizzazione strutturale della isoforma plasmatica e della isoforma mammaria della AGP. Nella lane A è stata caricata una aliquota di AGP purificata da latte. Nella lane B è stata caricata una aliquota di AGP purificata da sangue.

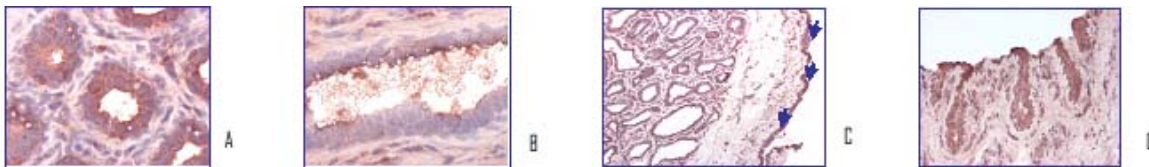


Figura 3. Localizzazione istochimica della AGP nella ghiandola mammaria bovina: A) Alveoli con ridotta attività secretiva (400X); B) Alveoli in secrezione (400X); C) Epitelio della cisterna (100X) positività indicata dalle frecce; D) Mucosa del capezzolo (200X).

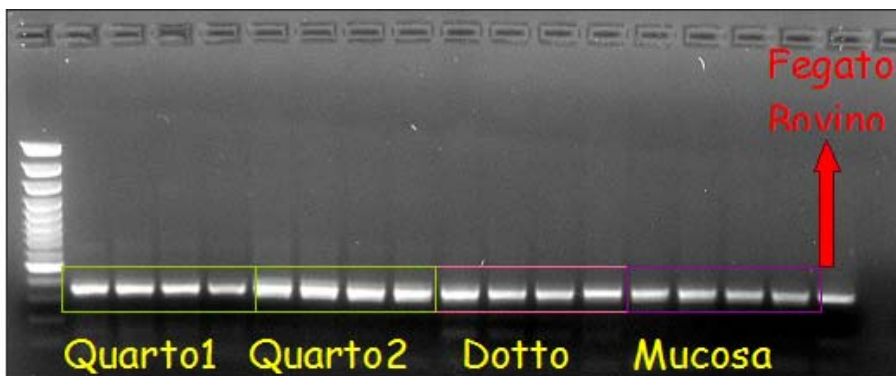


Figura 4 Studi di espressione mediante RT (reverse transcription) PCR. Sono state eseguite retrotrascrizioni a partire da due quarti di ghiandola mammaria (tessuto secernente). Ogni campione è stato riprodotto in duplicato con due concentrazioni (tal quale ed 1:10), epitelio della cisterna e mucosa del capezzolo.

EXPRESSION IN BOVINE MAMMARY GLAND AND SECRETION OF A MILK ISOFORMS OF THE ACUTE-PHASE PROTEIN α 1-ACID GLYCOPROTEIN

α 1-acid glycoprotein is an immunomodulatory protein expressed by hepatocytes in response to the systemic reaction of inflammation. Objectives of this short communication were to determine if the boAGP gene is also expressed in nonhepatic tissues, in particular in mammary gland epithelial cells.

These informations are very important in order to investigate if AGP can accomplish local immunomodulatory activity in milk during inflammatory reaction.

In order to study if the milk isoform of AGP was derived from blood AGP, we decided to go insight its primary structure investigating: a) the primary structure by means of cDNA sequencing and characterization of some of the oligosaccharide chains modifications that occurs during the post-translational processing of the protein by

means of electrophoresis pattern comparison of the two isoforms; b) the expression level of boAGP using both RT-PCR and immunohistochemical localization in tissue sections, in order to confirm that boAGP milk isoforms were really produced by mammary gland. Preliminary results showed that the sequence of cDNA from mammary gland samples are identical to those from hepatic origins, even if the electrophoretic patterns of the two proteins are different. We therefore may conclude that the gene that code for the two isoforms is the same, but different post-translational processing of the two isoforms occurs in mammary gland and liver.

Keywords: α_1 -acid glycoprotein (AGP), mammary gland, milk

VALORE DIAGNOSTICO DELLA B-CATENINA NEI TUMORI DELLE GHIANDOLE EPATOIDI DEL CANE

Mazzullo Giuseppe, Sfacteria Alessandra, Cataldi Marielda, De Vico Gionata

Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria, Sezione di Patologia Generale e Anatomia Patologica Veterinaria – Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Messina

Le glicoproteine coinvolte nell'adesione tra cellule neoplastiche e cellule e matrice extracellulare (ECM) partecipano all'acquisizione di un fenotipo tumorale invasivo e metastatico. La β -catenina, una glicoproteina di 92-kDa responsabile dell'adesione tra cellule e tra cellule e matrice extracellulare, si lega direttamente al dominio citoplasmatico della E-caderina e alla rete di microfilamenti actinici del citoscheletro cellulare. Inoltre è un componente critico delle vie di trasduzione del segnale mediate dal Wnt coinvolte nella proliferazione e differenziazione cellulare; per tale motivo, si ritiene possa essere coinvolta sia nella trasformazione che nella progressione neoplastica. Normalmente la β -catenina è localizzata a livello delle membrane cellulari, ma nel corso di sindromi neoplastiche tende ad accumularsi nel citoplasma ed eventualmente nel nucleo delle cellule coinvolte. Per approfondire la patogenesi dei tumori delle ghiandole epatoidi del cane abbiamo valutato, mediante immunistochemica, l'espressione della β -catenina in 30 lesioni classificate, secondo il WHO, in adenomi (8), epiteliomi (12) e carcinomi (10). I nostri risultati evidenziano la positività delle ghiandole perianali del cane e dimostrano che l'immunoreattività di membrana è forte negli adenomi, diminuisce negli epiteliomi e risulta spesso assente nei carcinomi in relazione anche al grado di anaplasia. Le differenti espressioni evidenziate nelle lesioni esaminate rispecchiano quanto finora riportato in letteratura sia nell'uomo che nel cane in altri tipi di tumori. In particolare, l'intensa positività di membrana nelle lesioni benigne e la sua diminuita espressione con il progredire della neoplasia verso forme più maligne ci porta a speculare sul ruolo della β -catenina nell'insorgenza dei tumori delle ghiandole epatoidi del cane e sul suo eventuale valore diagnostico e prognostico.

Parole chiave: Ghiandole perianali, immunistochemica, β -catenina, cane

DIAGNOSTIC VALUE OF B-CATENIN HEPATOID GLAND TUMORS OF DOG

Glycoproteins involved in adhesion between neoplastic cells and extracellular matrix are responsible of tumour invasiveness and metastasis. β -catenin, a 92 K-Da glycoprotein responsible for adhesion of cell to cell and extracellular matrix, binds directly to the intracytoplasmic domain of E-cadherin and to the network of cytoskeleton actinic microfilaments. Moreover, β -catenin is a mediator of Wnt signal transduction pathways that regulate cell proliferation and differentiation; therefore it seems to be involved in transformation and progression of several tumors. During the neoplastic differentiation, β -catenin translocates from the cell membrane, its usual localization, to the cytoplasm and even to the nucleus of involved cells. In order to better understand the mechanisms underlying the pathogenesis of canine hepatoid gland tumours, we performed a β -catenin immunohistochemical study on 30 lesions classified, according to the WHO, in adenoma (8), epithelioma (12) and carcinoma (10). Our results show different patterns of stain in the examined lesions being β -catenin positivity of cell membrane very strong in adenomas and varying from moderate to weak or absent in less differentiated lesions (epitheliomas and carcinomas). These data, consistent with previous reports both in dog and human beings affected by other kind of neoplastic lesions, focus on the diagnostic and prognostic value of β -catenin in hepatoid gland tumors of dog.

Keywords : Hepatoid gland, immunohistochemical, β -catenin, dog

LEIOMIOSARCOMA INTRA-ADDOMINALE IN UN FURETTO (*MUSTELA PUTORIUS FURO*): CARATTERIZZAZIONE ISTOPATOLOGICA ED IMMUNOISTOCHEMICA

Pezzolato Marzia, Varello Katia, Mascarino Daniela, Vascellari Marta*, Bozzetta Elena

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta - Area Neuroscienze e Genetica-Laboratorio di Immunoistopatologia, Via Bologna 148, 10154 Torino

** Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Laboratorio Istopatologia, Viale dell'Università 10, 35020 Legnaro (PD)*

Un furetto (*Mustela putorius furo*) di 5 anni femmina, con segni di letargia, alopecia e ipotermia, è stato condotto a visita presso un ambulatorio veterinario: il soggetto appariva depresso e presentava una neoformazione palpabile a livello addominale evidenziata anche con accertamento ecografico. Si è proceduto quindi a laparotomia esplorativa ed è stato evidenziato un nodulo singolo di 3 centimetri di diametro in contiguità con le anse intestinali. In seguito al decesso intra-operatorio, il veterinario ha proceduto all'asportazione della massa simil linfonodale già evidenziata ecograficamente, alla sua fissazione in formalina ed all'invio al laboratorio di Istologia dell' Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Torino per poterne identificare la natura. La massa era ben delimitata, di consistenza solida e colore biancastro. All'esame istopatologico si evidenziava una neoformazione rotondeggiante incapsulata, composta da cellule fusate disposte a fasci con caratteri di atipia, elevato grado di anisocitosi, indice mitotico moderato, cromatina addensata e nucleoli evidenti. Si rilevava inoltre un'area necrotica centrale. Le diagnosi differenziali considerate sono state: fibrosarcoma, tumore delle guaine nervose periferiche, emangiosarcoma, raiomiosarcoma e leiomiosarcoma. Per poter caratterizzare il tumore si sono effettuate indagini immunoistochimiche (citocheratine, vimentina, S-100, melan-A, fattore VIII, desmina, actina, α -actina). La negatività della popolazione neoplastica alle citocheratine e al melan-A ha permesso di escludere un tumore di origine epiteliale e dei melanociti; quella all' S-100 e al fattore VIII ha permesso di escludere un tumore delle guaine nervose periferiche e dell'endotelio, mentre la positività alla vimentina e all'actina hanno permesso di identificare un tumore delle cellule muscolari. Per poter operare una diagnosi differenziale tra raiomiosarcoma e leiomiosarcoma si è proceduto alla colorazione immunoistochimica con α -actina a cui le cellule neoplastiche sono risultate positive. Sulla base del riscontro istopatologico ed immunoistochimico è stata formulata una diagnosi di leiomiosarcoma.

Parole chiave: furetto, leiomiosarcoma, addome

INTRA-ABDOMINAL LEIOMYOSARCOMA IN A FERRET (*MUSTELA PUTORIUS FURO*): HISTOPATHOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL CHARACTERIZATION

A 5 years old female ferret with lethargy, alopecia and hypothermia was conducted to veterinary examination: the ferret was depressed and had an abdominal palpable mass confirmed at echo-graphic examination. During an explorative laparotomy a single nodule was found adjacent the intestinal loops. Following the death of the animal occurred during the surgery, the clinician removed the lymph-node-like nodule and sent it to the laboratory of Histology of Istituto Zooprofilattico Sperimentale of Torino. The round mass was well circumscribed, solid and white. Histologically at low magnification appeared encapsulated and built up by a population of atypical spindle cells arranged in interwoven fascicles. The cells had high anisocytosis degree, moderate mitotic activity and prominent nucleoli. A central area of necrosis was present. To characterise the tumour immunohistochemically cytokeratin, vimentin, S-100, melan-A, factor VIII, desmin, actin and α -actin were applied. Neoplastic cells resulted negative to cytokeratin, melan-A, factor VIII, S-100, desmin while were positive to vimentin, actin and α -actin. Based on the histological pattern and the immunohistological findings a diagnosis of leiomyosarcoma was made.

Keywords: ferret, leiomyosarcoma, abdomen

MELANOSI NEL SUINO NERO SICILIANO. CONTRIBUTO ALLA CONOSCENZA ED IPOTESI EZIO-PATOGENETICHE

Lanteri Giovanni, Liotta Luigi, Marino Fabio, Chiofalo Vincenzo, Macrì Battesimo

Dip Sanità Pubblica Veterinaria, Sez di Patologia Generale e Anatomia Patologica Veterinaria, Dip. di MO.BI.FI.PA., Sez. di Zootecnica, Università di Messina, Polo Universitario dell'Annunziata, 98100 Messina, Italy

Lo scopo del presente lavoro è descrivere una pigmentazione patologica occasionalmente riscontrata nei linfonodi e nel grasso sottocutaneo di alcuni suini neri siciliani. 13 suini neri siciliani, non consanguinei, regolarmente macellati, mostravano una atipica colorazione nerastra a livello di tutti i linfonodi. In due soggetti la pigmentazione appariva interessare anche il grasso sottocutaneo a livello del tratto lombare della colonna vertebrale. Campioni di tessuto linfonodale e adiposo sono stati in parte fissati in formalina al 10% e inclusi in paraffina, in parte processati per il taglio al criostato. Le sezioni seriate ottenute, dello spessore di 5 µm sono state colorate con Ematossilina Eosina, Blue Nilo, Melanin Bleach, Perossido di idrogeno, Millon e Lillie. Le sezioni colorate con E.E. hanno permesso di evidenziare un pigmento bruno di aspetto granulare intracellulare nei linfonodi; lo stesso pigmento era presente anche nel tessuto connettivo del tessuto adiposo sottocutaneo. La colorazione elettiva col Blue Nilo mostrava una colorazione verde scuro che suggeriva una diagnosi di melanosì. Inoltre, altri due test istochimici (Melanin bleach e Hydrogen peroxide) confermavano la scomparsa del pigmento. La reazione di Millon per la tirosina dava esito positivo, mettendo in evidenza una colorazione rosso-giallastra del tessuto linfonodale. Infine, il metodo di Lillie (al ferro ferroso), metteva in evidenza dei granuli verde scuro come ulteriore conferma della melanosì. La melanosì è in generale un evento insolito nei suini, occasionalmente osservato come reperto di macellazione (Marcato, 2002; Capucchio et al., 2000). La pigmentazione di per se non costituisce patologia, ma merita di essere descritta in quanto rara nei suini e di significato ignoto e, per questo, meritevole di discussione anche in considerazione di un'eventuale diagnosi differenziale con melanoma, lipofuscinosi e pigmentazione ceroidale.

Parole chiave: suino nero siciliano; melanosì; istochimica; patogenesi

MELANOSIS IN SICILIAN BLACK SWINES. CONTRIBUTION TO THE KNOWLEDGE AND ETIO-PATHOGENETIC HYPOTHESIS

The study is aimed at describing a black pigmentation occasionally observed in lymph nodes and subcutaneous fat of Sicilian black swines. 13 Sicilian black pigs, without parental relationships, regularly slaughtered, showed an atypical black coloration in all lymph nodes. Two of these subjects had pigmentation also in the subcutaneous fat. Tissues samples were fixed part in 10% neutral formalin and embedded in paraffin wax, and part cut at cryostat. Serial sections were stained with HE, Blue Nile, Melanin Bleach, Hydrogen peroxide, Millon and Lillie method. HE stained sections let us to detect a brownish intracellular granular pigment in lymph nodes; the same pigment was observed in the connective tissue within subcutaneous fat. The Blue Nile staining highlights a green dark colour. Moreover Melanin bleach and Hydrogen peroxide showed the disappearance of the pigment. The Millon reaction for tyrosine was positive. Finally the Lillie method emphasizes green dark granules confirming melanosì. Melanosì is actually an unusual finding occasionally observed in pig (Marcato, 2002; Capucchio et al., 2000). The pigmentation itself is not a pathology, but it is interesting to describe because it is rare and scarcely known in swine; for this reason, it is a good topic for discussion, also considering differential diagnosis with melanoma, lipofuscinosi and ceroid pigmentation.

Keywords: sicilian black swine; melanosì; histochemistry; pathogenesis

VASCULOPATIA RETINICA IN GATTI CON INSUFFICIENZA RENALE CRONICA: DATI PRELIMINARI

Giudice Chiara, Muscolo Cristina, Rondena Marco, Grieco Valeria

*Sezione di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviaria, Università degli Studi di Milano, via
Celoria 10, 20133 Milano*

L'ipertensione sistemica (IS) secondaria ad insufficienza renale cronica (IRC), è una sindrome molto importante in medicina umana e felina. Nel gatto sono note, dal punto di vista clinico, le alterazioni vascolari del fundus oculare in corso di IS. Scopo di questa segnalazione era valutare, istologicamente, le lesioni dei vasi oculari in 4 gatti Comuni Europei (età 13-18 anni, 2M/2F) sottoposti ad eutanasia per diagnosi clinica di ISS/IRC. Venivano eseguiti esami sierologici e clinici comprendenti la pressione sistolica (Psist), ed esame istologico di rene ed occhio. Globi oculari di 4 gatti di età comparabile, non affetti da IRC, erano utilizzati come controlli. In 4/4 gatti il profilo renale era alterato, associato a proteinuria. L'esame fundoscopico in 1/4 evidenziava microemorragie e tortuosità vascolare; IOP era sempre nella norma. La Psist, valutabile in 2 soggetti, era 240 e 250 mmHg. Istologicamente in tutti i soggetti erano presenti da glomerulonefrite membranosa con lieve fibrosi fino a pannefrite sclerosante. A livello oculare si rilevavano ora edema perivascolare intraretinico ora arteriolosclerosi retinica/coroidea. La gravità delle lesioni renali ed oculari aveva andamento parallelo. In 2 casi la Psist elevata consentiva di ricostruire il possibile meccanismo eziopatogenetico della vasculopatia. Le lesioni oculari osservate erano compatibili con quelle da IS "benigna" dell'uomo, raramente descritte nel gatto. Queste lesioni impongono diagnosi differenziale con arteriolosclerosi senile, non riscontrata tuttavia nei controlli, e con lesioni secondarie ad innalzamento della IOP che, nei gatti esaminati, era sempre nella norma. I dati raccolti, ancorché di numero ridotto, invitano a considerare con attenzione le lesioni vascolari del fundus come possibili indicatori di IS.

Parole chiave: insufficienza renale, ipertensione, retina, gatto, arteriosclerosi

INTRODUZIONE

Le patologie microvascolari sono un riscontro frequente in pazienti con insufficienza renale cronica (IRC) ed ipertensione sistemica secondaria (ISS). Tra i tessuti target del danno vascolare da IRC/ISS, retina e corioide sono oggetto di particolare attenzione per l'accessibilità del loro comparto vascolare all'osservazione diretta, non invasiva (fundoscopica) e, quindi, per la possibilità che esse offrono di monitoraggio della progressione delle lesioni.

Scopo di questa segnalazione è stato valutare le lesioni istologiche dei vasi retinici e coroidi in gatti affetti da ipertensione sistemica secondaria ad insufficienza renale cronica.

MATERIALI E METODI

Sono stati esaminati 4 gatti, di età compresa tra 13 e 18 anni, 2 maschi e 2 femmine, 3 comuni europei ed 1 incrocio certosino. Di tutti i soggetti sono stati eseguiti profilo biochimico

renale, esame delle urine, esame fundoscopico e rilevazione della pressione intraoculare (IOP) nonché, quando le condizioni del soggetto lo permettevano, della pressione sistolica e diastolica (Ps, Pd). Tutti i gatti sono stati sottoposti ad eutanasia a causa del peggioramento delle condizioni generali attribuibile a IRC. Reni e globi oculari, prelevati in corso di esame necroscopico completo e fissati in formalina, sono stati oggetto di accurate indagini istologiche. Globi oculari prelevati in corso di necropsia da 4 gatti di età comparabile ma non affetti da IRC, sono stati esaminati come controlli.

RISULTATI

I risultati relativi agli esami di laboratorio ed alla valutazione della pressione sistolica sono elencati in tabella 1. In due soggetti, giunti alla visita clinica in stato di collasso cardio-circolatorio, non è stato possibile valutare la Ps. L'esame fundoscopico era nella norma in 3/4 soggetti, in uno si evidenziavano piccole

emorragie vitreali e tortuosità vascolare (fig. 1). IOP era sempre nella norma (< 18 mmHg). All'esame istologico i reni erano affetti bilateralmente da lesioni di differente estensione e gravità (da glomerulonefrite membranosa con lieve nefrite interstiziale linfoplasmacellulare e fibrosi a pan-nefrite sclerosante). A livello oculare si evidenziavano edema perivascolare intraretinico, ispessimento delle pareti arteriolarie retiniche e coroidi (arteriolosclerosi – fig 2) e focale interruzione dell'endotelio con trasudazione plasmatica intraparietale. I vasi retinici e coroidi dei globi oculari nei gatti utilizzati come controlli non presentavano alterazioni istologiche di rilievo.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nella specie felina sono note, soprattutto dal punto di vista clinico, le alterazioni retiniche/coroidi in corso di ipertensione sistemica secondaria ad insufficienza renale cronica (IRC). La maggior parte delle segnalazioni concerne lesioni riferibili a gravi retinopatia e coroidopatia caratterizzate da emorragie, trombosi e necrosi fibrinoide arteriolare, instauratesi a seguito di repentini e violenti aumenti della pressione sistolica, corrispondenti a quanto in medicina umana viene talvolta riferito come "ipertensione maligna". Meno studiate, nel gatto, sono invece le lesioni del fundus in corso di ipertensione "benigna" cronica. I casi da noi esaminati riguardano gatti con anamnesi clinica remota di insufficienza renale cronica, spesso controllata terapeuticamente. In tutti i gatti la gravità delle lesioni oculari era correlata a quella delle lesioni renali. Le lesioni oculari osservate, dominate da aspetti di arteriolosclerosi, erano compatibili con quelle da IS "benigna" dell'uomo, raramente descritte nel gatto. In 2 casi la conferma di valori di Psist elevata consentiva di ricostruire il possibile meccanismo eziopatogenetico della vasculopatia. Occorre tuttavia rilevare che lesioni arteriolosclerotiche dei vasi oculari, in assenza di necrosi fibrinoide, sono state segnalate, in medicina umana, anche in relazione ad aumento della pressione

intraoculare (IOP) o, semplicemente, quale effetto della senescenza ed è ritenuto pertanto importante operare diagnosi differenziale nei confronti di queste due condizioni. Nei gatti da noi esaminati i valori di IOP erano sempre entro i limiti della norma. Inoltre lesioni arteriolosclerotiche simili a quelle dei soggetti affetti da IRC/ISS non sono state riscontrate a carico dei globi oculari dei gatti, anch'essi di età avanzata, utilizzati come controllo. I dati preliminari da noi raccolti, ancorché di numero molto ridotto, sembrano confermare la sovrapponibilità delle lesioni vascolari oculari nel gatto con quelle dell'uomo e invitano a considerare con maggiore attenzione lesioni vascolari del fundus, anche quando di grado lieve, come possibili indicatori di ipertensione sistemica. La possibilità di diagnosi precoce di danno ipertensivo si riflette infatti positivamente sulle scelte cliniche e terapeutiche.

BIBLIOGRAFIA

1. Apple DJ., Rabb MF. Fundus. In: Ocular Pathology. Clinical applications and self-assessment. 5th Edition, Mosby-Year Book, Capitolo 8: 354-479.
2. Crispin SM, Mould JR. Systemic hypertensive disease and the feline fundus. *Vet Ophthalmol.* 2001; 4 (2): 131-140.
3. Green WR. Retina. In: Ophthalmic Pathology. An Atlas and Textbook. Spencer WH, 4th Edition, Saunders WB Company, 1996; capitolo 9: 1108-1117.
4. Hurcomb PG, Wolffsohn JS, Napper GA. Ocular signs of systemic hypertension: a review. *Ophthalmic Physiol Opt.* 2001; 21 (6): 430-440.
5. Lee WR. Retinal Vascular Disease. In: Ophthalmic Histopathology, 2nd Edition, Springer-Verlag London, 2002; Capitolo 4: 101-130.
6. Maggio F, DeFrancesco TC, Atkins CE, Pizzirani S, Gilger BC, Davidson MG. Ocular lesions associated with systemic hypertension in cats: 69 cases (1985-1998). *J Am Vet Med Assoc.* 2000; 217 (5): 695-702.
7. Wolffsohn JS, Hurcomb PG. Hypertension and the eye. *Curr Hypertens Rep.* 2002; 4(6): 471-476.

CASO		P sistolica (mmHg)	Esame biochimico			Esame urine	
			Creatinina (mg/dl)	BUN (mg/dl)	P (mg/dl)	Ps	Proteinuria
1	CE x certosino, F, 13 a	250	11,2	178	>20	1030	++
2	CE, M, 15 a	n.d.	14,1	> 200	> 20	1025	+++
3	CE, M, 17 a	240	5,4	120	5,8	1035	++
4	CE, F, 18 a	n.d.	4,2	180	5,1	1030	++

n.d. non determinabile



Figura 1. Esame clinico, aspetto del fundus oculare: evidente tortuosità vascolare in entrambi gli occhi, accompagnata, nell'occhio sinistro, da piccole emorragie

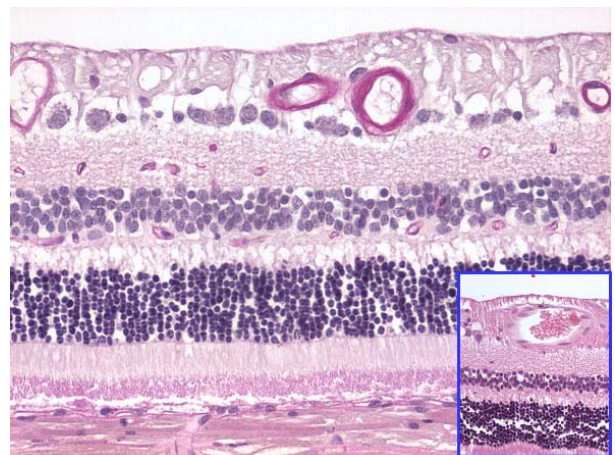


Figura 2. Retina sovratapetale: diffuso ispessimento arteriosclerotico della parete delle arteriole retiniche dello strato delle fibre (PAS, 20x) Insetto: arteriola retinica normale (EE, 20x)

RETINAL VASCULOPATHY IN CATS WITH CHRONIC RENAL FAILURE: PRELIMINARY DATA

Systemic hypertension (SH) secondary to renal failure (RF) is an important disease in both human and feline medicine. Clinically detectable, vascular lesions of feline fundus have been previously described. Aim of this report is to histologically evaluate eye vascular lesions in 4 domestic cats (13-18 years, 3M/2F), euthanized for SH/RF. Blood biochemistry, clinical examination, systolic pressure and histology of eye and kidneys were performed. Eyes from 4 cats, not affected by RF, served as controls. 4/4 cats had elevated Creatinin levels and proteinuria. Only 1/4 cats had small hemorrhages and arteriolar narrowing at fundus examination, IOP was always normal. SystP, obtained in 2/4 cats, was 240 and 250 mmHg. Histologically, membranous glomerulonephritis to nephrosclerosis affected kidneys. Perivascular intraretinal edema and arteriosclerosis were main ocular lesions. Renal lesion severity parallels that of eye lesions. In 2 cases, high systP values supported the SH etio-pathogenic hypothesis for vascular lesions. Vessel lesions were consistent with human benign SH vasculopathy, rarely described in cats. Differential with senile or elevated IOP-induced arteriosclerosis is important. In our cases, control cats had no lesions and IOP was always normal. Our preliminary data confirm the analogy between cat and human lesions during SH and suggest a careful evaluation of "minor" fundus lesions as indicators of SH.

Keywords: renal failure, hypertension, retina, feline, arteriosclerosis

RILIEVI ISTOPATOLOGICI ED IMMUNOISTOCHEMICI IN PLACENTE IN CORSO DI ABORTO BOVINO: STUDIO DI CAMPO

Pittioni Eugenio, Pascotto Ernesto, Galeotti Marco

Dipartimento di Scienze Animali, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Udine

La patologia placentare ricopre grande importanza nella diagnosi eziologica dell'aborto bovino e più volte, in letteratura, si è espressa la necessità di operare un campionamento di questo organo per aumentare le probabilità di identificare una precisa causa abortiva. Tuttavia il campionamento della placenta, in condizioni di campo, non sempre risulta possibile. Il presente studio illustra i quadri istopatologici ed immunoistochimici riscontrati nei 28 campioni placentari su una casistica totale di 48 casi di aborti.

I campioni oggetto dello studio provengono per la gran parte da prelievi necroscopici effettuati in campo da veterinari liberi professionisti nel periodo aprile 2003 – aprile 2006, quattro feti, con le rispettive placente, sono stati inviati in toto al laboratorio. Uno “screening” istologico delle lesioni osservate nei tessuti placentari, ha consentito di discriminare l'utilizzo delle migliori metodiche (colorazioni di Gram, di Grocott e PAS, immunoistochimica) ogni qualvolta si riscontravano determinati patogeni o lesioni ad essi riferibili. Solo pochi campioni non presentavano alterazioni patologiche, mentre la tipologia delle lesioni variava, rivelando, in modo piuttosto costante, il coinvolgimento della componente vascolare dell'organo spesso sotto forma di vasculite. La presenza di patogeni era in alcuni casi evidente già ad una prima osservazione, e vedeva coinvolti batteri, miceti ed inclusioni di probabile origine virale, agenti osservabili spesso solo a livello placentare. I risultati di questa indagine confermano l'importanza del campionamento placentare e dell'analisi accurata ed approfondita dei campioni al fine di ottenere una diagnosi eziologica del fenomeno abortivo nel bovino.

Parole chiave: patologia; istologia; immunoistochimica; placenta; bovino

INTRODUZIONE

La valutazione istologica delle placente si dimostra utile, quando non indispensabile, per la diagnosi di aborto bovino causato da vari agenti patogeni come:

- (1) batteri, quali *Arcanobacterium pyogenes*, *Coxiella Burnetii*, *Chlamydia* sp. e batteri occasionali non riconosciuti come abortigeni e quindi valutabili come patogeni occasionali (Campero et al. 2005; Bildfell et al. 2000; Kirkbride 1992a);
- (2) virus, come IBR (con lesioni già interpretabili all'esame istologico) (Kirkbride 1992b) o BVDV (all'esame immunoistochimico) (Fredriksen et al. 1999);
- (3) miceti, per cui la placenta è l'organo di elezione, in quanto il patogeno solitamente non esplica azione lesiva in altri organi (Hillman e McEntee 1968);
- (4) parassiti protozoari, (es. *Tritrichomonas foetus*) (Rhyan 1995).

Nella pratica buiatria, tuttavia il campionamento di tale organo non sempre è possibile soprattutto in caso di ritenzione placentare o scomparsa della stessa (dovuta a stabulazione libera e/o cani o altri animali carnivori in allevamento etc) (Kirkbride 1986). Scopo del seguente studio è di illustrare i quadri anatomopatologici nella placenta bovina in corso di aborto e valutare l'importanza che tale organo ricopre ai fini diagnostici.

MATERIALI E METODI

Sono stati analizzati i campioni di 48 feti bovini abortiti naturalmente reperiti in stalle della pianura Pordenonese e della zona di Cividale e Valli del Natisone (Nord-est della provincia di Udine) nel periodo aprile 2003 – aprile 2006. La necropsia e la campionatura dei feti è avvenuta in campo ad opera di veterinari liberi professionisti, eccetto per 5 feti inviati interi al laboratorio. Basandosi sulla letteratura presente (Del Piero 2003, Cavirani 1999) gli organi campionati sono stati: lingua, encefalo, timo, polmone, cuore, prestomaci,

intestino, fegato, milza, muscolo diaframmatico, cute, placenta. Nello specifico, per quanto riguarda il campionamento della placenta, era stato richiesto l'invio di almeno due cotiledoni completi, dei quali è stata successivamente esaminata una porzione centrale di entrambi (Johnson et al. 1994). I tempi intercorrenti fra aborto e necropsia sono stati registrati. Dopo la fissazione, avvenuta per tempi variabili, la processazione, il taglio e la colorazione (ematossilina eosina) sono state effettuate secondo le metodiche attualmente in uso.

Si è provveduto quindi ad effettuare un primo esame microscopico con l'intento di valutare la qualità dei campioni e per l'osservazione di eventuali lesioni istopatologiche o agenti patogeni.

La valutazione qualitativa dei preparati è stata eseguita secondo metodica standardizzata già applicata in precedenti ricerche (Pittioni et al., 2005) ed ha preso in considerazione parametri di completezza strutturale, dettaglio citoplasmatico e dettaglio nucleare.

L'eventuale riscontro di lesioni o patogeni orientava la scelta di ulteriori esami utilizzando colorazioni speciali (GRAM/TWORT per batteri, GROCOTT e Pas per funghi). La tecnica immunoistochimica è stata utilizzata per confermare l'eventuale presenza di virus IBR e BVD.

La valutazione parametrica, le eventuali lesioni istopatologiche e i risultati degli esami successivi venivano registrati su apposito database informatico MySQL 4.0.18 (©MySQL AB), amministrato tramite client Openoffice 1.3.0 (©Sun microsystem inc.), Linux OS.

RISULTATI

Su un totale di 48 aborti i campioni placentari sono stati 27.

La conservazione dei campioni placentari risultava paragonabile a quella dei campioni di altri organi, migliore tuttavia la conservazione strutturale (n. 27; $p < 0.05$).

Dei 27 campioni 4 presentavano nessuna o lievissime lesioni mentre 2 risultavano, per la pessima qualità del campione, illeggibili.

Le lesioni riscontrate più frequentemente sono state:

- focolai necrotici (17 casi) per la maggior parte localizzata nello stroma dei villi;
- vasculite (14 casi), prevalentemente (9 casi) a carattere necrotizzante;
- infiltrato leucocitario (14 casi), per lo più (5 casi) perivasale;
- in 13 casi si osservava, all'interno dei vasi, un aumento della componente leucocitaria (richiamo leucocitario);
- ipertrofia trofoblastica/ incremento dei trofoblasti binucleati (10 casi);
- mineralizzazione placentare (9 casi);
- metaplasia squamosa del trofoblasto (8 casi);

Per quanto riguarda agenti patogeni direttamente osservabili, in 9 casi si rilevava la presenza di batteri valutati, per la localizzazione e l'assenza di lesioni tissutali, contaminanti ambientali post-mortali (Kirkbride 1992a). In 5 casi, invece, gli ammassi batterici erano presenti all'interno di reazioni flogistiche di varia entità, talvolta con fenomeni di fagocitosi, e venivano considerati come possibile di cause di placentite; in nessun altro organo dello stesso aborto si osservavano batteri. In 3 casi erano ben evidenti ife fungine, ma solamente in uno di essi, la diagnosi è stata di placentite mitotica pura, data la gravità delle lesioni e l'assenza a successivi esami di altri patogeni, nei rimanenti casi si associava la positività alla prova immunoistochimica anti-IBR, ed una grave infezione batterica, pertanto la micosi veniva valutata come concomitante o secondaria; anche in questi casi il patogeno era osservabile solo a livello placentare. Infine solo in un caso, e solo nella placenta, si sono osservate inclusioni virali da virus IBR.

Con le metodologie immunoistochimiche, si è avuto esito positivo utilizzando l'anticorpo anti-IBR in 4 casi, con positività localizzata soprattutto nell'epitelio coriale e nelle cellule trofoblastiche della placenta.

Nelle placente l'anticorpo anti-BVD non ha rilevato antigeni virali, malgrado la positività sia stata rilevata in 3 casi in altri organi (milza ed intestino), la diagnosi di aborto conseguente ad infezione da BVD è stata emessa, quindi, indipendentemente dal campione placentare.

In totale, come si evidenzia in TABELLA 1 grazie al campione placentare si è giunti ad una possibile diagnosi nel 37% dei casi di aborto per cui era disponibile la placenta, mentre in

un altro 18% la diagnosi è stata possibile grazie all'osservazione di altri organi.

Riassumendo nei casi di aborto con campione placentare, le cause possono essere così ripartite:

- 5 aborti dovuti a probabile placentite batterica;
- 4 aborti dovuti ad infezione da virus IBR rilevato soprattutto a livello placentare;
- 1 aborto dovuto a placentite micotica;
- 3 aborti dovuti ad infezione da virus BVD;
- 2 aborti dovuti ad infezioni batteriche.

DISCUSSIONE

I quadri anatomoistopatologici della placenta in corso di aborto rilevati in questo studio concordano con quelli presenti in letteratura. La loro tipologia, distribuzione e frequenza risultano essere comuni sia in presenza di diversi agenti patogeni che in loro assenza, pertanto non consentono una diagnosi eziologica (Kraipowich et al. 2000, van Dreumel e Kierstead 1975, Murray 1991, Barr e Anderson 1993). Si sottolinea, tuttavia, l'importanza del campionamento placentare che offre molto spesso la possibilità di osservare direttamente (batteri e funghi) o indirettamente (immunoistochimica anti-IBR) i patogeni causa di aborto non altrimenti localizzabili in altri organi (Murray 1990, Kirkbride 1982 e 1986).

CONCLUSIONI

Per qualsiasi protocollo laboratoristico viene più volte ricordato come la qualità e disponibilità, in termini di organi o altri elementi da raccogliere, nel campionamento sia fondamentale per ottenere una risposta diagnostica affidabile. Il presente studio sottolinea l'importanza diagnostica del campionamento placentare in corso di aborto bovino.

RINGRAZIAMENTI: Gli autori desiderano ringraziare per la preziosa collaborazione: i Dott.ri Bruno Cantarutti e Daniele Gallo per il reperimento e campionamento dei casi; il Dott. Loris Alborali dell'IZS dell'Emilia e Lombardia per la fornitura degli anticorpi usati nel presente lavoro.

BIBLIOGRAFIA

1. Barr, B. C.; Anderson, M. L. (1993). Infectious Diseases Causing Bovine Abortion And Fetal Loss. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 9(2):343-68
2. Bildfell, R. J.; Thomson, G. W.; Haines, D. M.; McEwen, B. J.; Smart, N. (2000). Coxiella Burnetii Infection Is Associated With Placentitis in Cases Of Bovine Abortion. *J Vet Diagn Invest* 12(5):419-425
3. Campero, C. M.; Anderson, M. L.; Walker, R. L.; Blanchard, P. C.; Barbano, L.; Chiu, P.; Martinez, A.; Combessies, G.; Bardon, J. C.; Cordeviola, J. (2005). Immunohistochemical Identification Of Campylobacter Fetus in Natural Cases Of Bovine And Ovine Abortions. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 52(3):138-141
4. Cavarani, S. (1999). L'Aborto Infettivo Nel Bovino, Aspetti Eziopatogenetici, Criteri Diagnostici, Considerazioni di Carattere Epidemiologico in Allevamenti Da Latte. *Large Animal Review* 5(4):13-24
5. DelPiero, F. (2003). Aborti Infettivi Dei Ruminanti *Large Animal Review* 9(1):11-27
6. Fredriksen, B.; Press, C. M.; Sandvik, T.; Odegaard, S. A.; Laken, T. (1999) Detection Of Viral Antigen in Placenta And Fetus Of Cattle Acutely Infected With Bovine Viral Diarrhea Virus. *Vet Pathol* 36(4):267-725
7. Hillman, R. B.; McEntee, K. (1969) Experimental Studies On Bovine Mycotic Placentitis. *Cornell Vet* 59(2):289-302
8. Johnson, C. T.; Lupson, G. R.; Lawrence, K. E. (1994) The Bovine Placentome in Bacterial And Mycotic Abortions. *Vet Rec* 134(11): 263-266
9. Kirkbride, C. A. (1982). Diagnostic Approach To Abortion in Cattle. *The Compendium Of Continuing Education* 4(8):5341-5346
10. Kirkbride, C. A. (1986). Examination Of Bovine And Ovine Fetuses. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2(1):61-83
11. Kirkbride, C. A. (1992a) Etiologic Agents Detected in a 10-Year Study Of Bovine Abortions And Stillbirths. *J Vet Diagn Invest* 4(2):175-80
12. Kirkbride, C. A. (1992b) Viral Agents And Associated Lesions Detected in a 10-Year Study Of Bovine Abortions And Stillbirths. *J Vet Diagn Invest* 4(4):374-379
13. Kraipowich, N. R.; Morris, D. L.; Thompson, G. L.; Mason, G. L. (2000). Bovine Abortions Associated With Bacteroides Fragilis Fetal Infection. *J Vet Diagn Invest* 12(4):369-371

14. Murray, R. D. (1990) A Field Investigation Of Causes Of Abortion in Dairy Cattle. *Vet Rec* 127(22):543-547
15. Murray, R. D. (1991) Lesions in Aborted Bovine Fetuses And Placenta Associated With Bovine Viral Diarrhoea Virus Infection. *Arch Virol (Suppl 3)*:217-224
16. Pittioni, E.; Pascotto, E.; Galeotti, M. (2005) BVD, rilievi istopatologici ed immunoistochimici in feti bovini abortiti: studio di campo. *Atti del II congresso nazionale A.I.P.Vet.*: 38-42.
- 19.
17. Rhyan, J. C.; Wilson, K. L.; Burgess, D. E.; Stackhouse, L. L.; Quinn, W. J. (1995) Immunohistochemical Detection Of *Tritrichomonas Foetus* in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Sections Of Bovine Placenta And Fetal Lung. *J Vet Diagn Invest* 7(1):98-101
18. van Dreumel, A. A.; Kierstead, M. (1975) Abortion Associated With *Hemophilus Somnus* Infection in a Bovine Fetus. *Can Vet J* 16(12):367-70

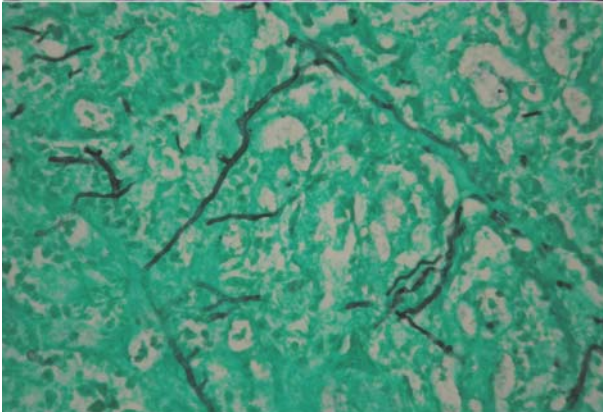
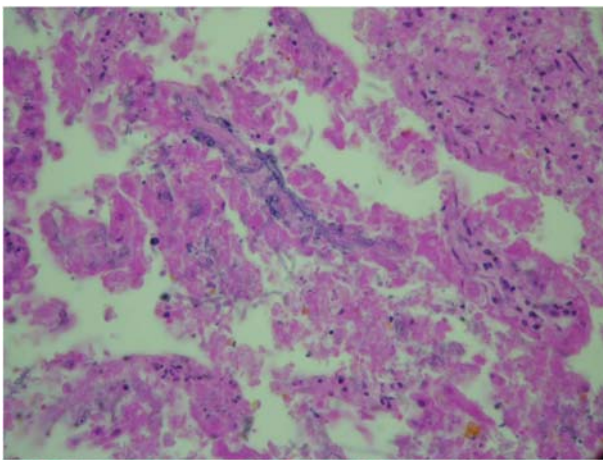


FOTO 1: placentite micotica. Ife fungine
 In alto EE, in basso Grocott
 Medio ingrandimento

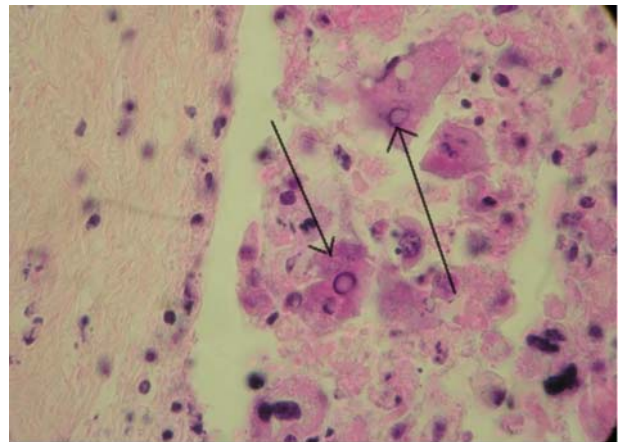


FOTO 2: placenta, inclusioni nucleari eosinofiliche
 in corso di infezione da IBR
 EE, forte ingrandimento

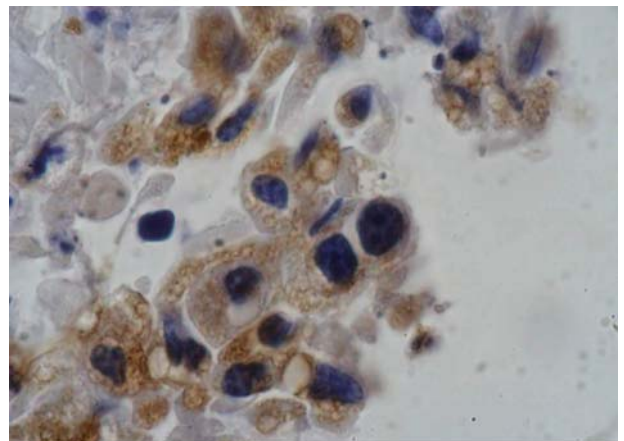


FOTO 3: placenta, positività immunoistochimica
 anticorpo anti-IBR
 Forte ingrandimento

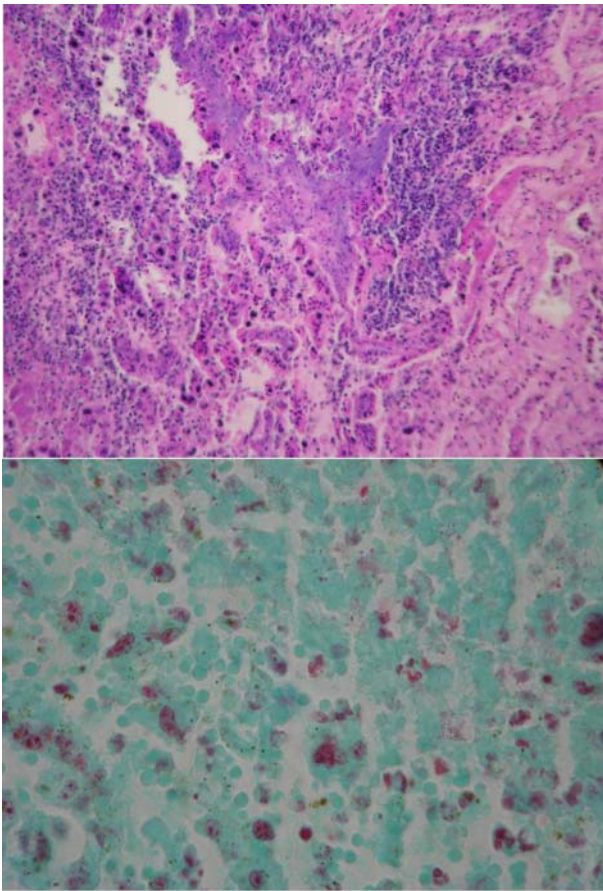


FOTO 4: placentite batterica.
 in alto: EE medio ingrandimento
 in basso. GRAM forte ingrandimento

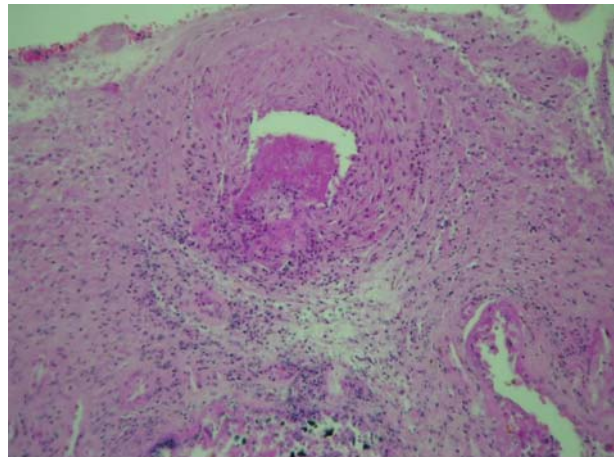


FOTO 5: placenta, vasculite necrotica / linfocitaria
 EE, medio ingrandimento

Tabella 1

	N° POSITIVI PLACENTA	N° POSITIVI	METODO
IBR	4 (15%)	4 (15%)	immunoistochimica
BVD	0	3 (11%)	immunoistochimica
BATTERI	5 (18%)	7 (26%)	GRAM/TWORT
MICETI	1 (4%)	1 (4%)	GROCOTT/Pas
TOTALE	10 (37%)	15(51%)	

N° POSITIVI PLACENTA = numero di aborti in cui la placenta presenta l'agente patogeno (direttamente o indirettamente)

N° POSITIVI = numero di aborti in cui l'agente patogeno è rilevabile in placenta e/o altri organi

HISTOPATHOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL FINDINGS OF PLACENTA IN CASE OF BOVINE ABORTION: A FIELD STUDY

The placental pathology has a great importance for the ethiological diagnosis of bovine abortion. Often, in scientific literature, the necessity to have a sample of placenta to improve the identification of the abortion's cause is underlined. However the sampling of placenta is not always possible in field conditions. This study shows the histopathological aspects of the 28 placenta samples taken from all 48 cases of abortion in our possession. The samples were collected, for the great part, on field by professional veterinarians from April 2003 until April 2006; four fetuses, with respective placentas, were sent whole to the laboratory. After a first histological examination, the particular method of staining (Gram, Grocott and PAS stain or immunohistochemistry) was decided on the basis of pathogens found or lesions of them. Only a few cases did not show lesions, and these were variable, but almost always they were localized in the vascular component of the organ (as vasculitis). In some cases, pathogens were already evident from the first examination, and these could include bacteria, mycetes and viral inclusions, often visible only in the placenta. The results of this study confirm the importance of placenta sampling and its precise and accurate analysis to have an ethiological diagnosis of the bovine abortion.

Keywords: pathology; histology; immunohistochemistry; placenta; bovine

ESPRESSIONE DELLA TIMIDINA FOSFORILASI NEI TUMORI MAMMARI DEL CANE

Zizzo Nicola^o, Tinelli Antonella^o, Lionetti Antonia^o, Labriola Angela^{oo}, Patruno Rosa^o,
Ranieri Girolamo^{oo}

^o Dipartimento Sanità e Benessere degli Animali, Facoltà di Medicina Veterinaria, Bari
^{oo} IRCCS – Ospedale Oncologico, Bari

La Timidina Fosforilasi (TP), enzima coinvolto nel metabolismo pirimidinico, è identico ad un fattore di crescita endoteliale derivato dalle piastrine (PD-ECGF). La TP risulta essere filogeneticamente conservata dagli organismi unicellulari procarioti (*E. coli*, *Salmonella* spp.) all' uomo.

Studi condotti negli ultimi anni nelle neoplasie maligne umane indicano che la TP è sovraespressa nei carcinomi epatici, gastrici, mammari e della prostata. Tale sovraespressione sarebbe legata al processo della cancerogenesi. In campo veterinario non ci sono studi riguardanti l' espressione della TP e la sua correlazione con la cancerogenesi e la progressione tumorale. A tal fine abbiamo ritenuto interessante studiare la TP nel modello spontaneo delle neoplasie mammarie del cane.

Sono stati selezionati 15 campioni di tessuto mammario neoplastico, classificati come adenocarcinomi tubulari e papillari, secondo Hampe e Misdorp (Bulletin of World Health Organization, 1974, 50,111-133), e negli stessi campioni è stato identificato il tessuto mammario adiacente non neoplastico. Le sezioni ottenute dai campioni sono state sottoposte ad esame immunostochimico (metodo avidina-biotina) impiegando l' anticorpo monoclonale TP PD-ECGF ab1(clone PGF44.c). Nei tessuti tumorali le cellule epiteliali hanno mostrato immunoreattività con percentuali oscillanti dal 10 al 90%, mentre le cellule epiteliali non tumorali sono risultate negative per l' immunocolorazione. Altre popolazioni cellulari positive alla TP sono state identificate come macrofagi e fibroblasti.

Dalla nostra indagine è emerso che la TP è sovraespressa nei tumori maligni della mammella del cane e pertanto riteniamo che essa possa avere un ruolo nel processo di cancerogenesi e progressione tumorale anche nelle neoplasie canine.

Parole chiave: timidina fosforilasi, tumore mammario, cane

INTRODUZIONE

La Timidina fosforilasi (TP) enzima coinvolto nel metabolismo pirimidinico è identico ad un fattore di crescita endoteliale derivato dalle piastrine (PD-ECGF) (2). La TP risulta essere filogeneticamente conservata dagli organismi unicellulari procarioti (*E. coli*, *Salmonella* spp) all' uomo. Essa catalizza la reazione Timidina $\leftarrow \rightarrow$ timidina+2 deossi-D-ribosio-1-fosfato (3). E' stato dimostrato l'attività chemiotattica dell' TP verso le cellule endoteliali in vitro e attività angiogenetica in vivo, anche se il meccanismo dell'attività angiogenetica non è ben conosciuta.

Studi condotti negli ultimi anni sulle neoplasie maligne umane indicano che la TP è sovraespressa nei carcinomi epatici, gastrici, mammari e della prostata. Tale sovraespressione sarebbe legata al processo

della cancerogenesi (3-6) è evidenziabile immunostochimicamente nelle cellule epiteliali, endoteliali, macrofagiche e mastocitarie .

In campo veterinario non ci sono studi sulle neoplasie spontanee, che abbiano caratterizzato il profilo di espressione della TP. A tal fine abbiamo ritenuto interessante studiare l' espressione di questo enzima (TP) nel modello spontaneo delle neoplasie mammarie del cane.

MATERIALI E METODI

Sono stati selezionati e studiati 15 campioni di tessuto mammario tumorale classificati come adenocarcinomi tubulari e papillari secondo Hampe e Misdorp (Bulletin of World Health Organization, 1974, 50,111-133) e negli

stessi campioni è stato identificato il tessuto adiacente non neoplastico. Sezioni seriali di 4 micron sono state sottoposte ad esame immunistoichimico con il metodo avidina-biotina-immunoperossidasi. Dopo la sparaffinatura e reidratazione con xilene ed etanolo, le sezioni sono state poste in microonde a 500 W per 10 minuti. Per l'inattivazione della perossidasi endogena le sezioni sono state trattate con una soluzione di perossido di idrogeno al 3% in metanolo per 20 minuti. Le sezioni sono state poi incubate con un anticorpo monoclonale anti-TP, il PD-ECGF ab-1(clone PGF.44c, Neo Markers, Fremont, California, USA) diluito 1:100 per 1 ora, successivamente con un anticorpo secondario biotinilato (Dako Glostrup, Denmark) per 30 min. La reazione con il cromogeno DAB (Vector Laboratories) ha prodotto un precipitato rosso. Il nucleo è stato controcolorato con l'Ematossilina di Gill's (Polysciences, Warrington, PA, USA). Le sezioni sono state esaminate con microscopio ottico a 40 x e 100 x.

RISULTATI

I campioni così trattati hanno espresso una positività immunistoichimica caratterizzata da una colorazione rosso intensa del citoplasma delle cellule epiteliali delle mammelle neoplastiche, prevalentemente ai bordi della lesione, lontano da zone necrotiche (Fig 1 e 2). La percentuale di cellule epiteliali positive oscillava dal 10 al 90%. Non abbiamo evidenziato reattività immunistoichimica nucleare. Debolmente colorati invece si presentavano i fibroblasti e i macrofagi. Assente qualsiasi reazione nelle mammelle normali.

DISCUSSIONE

Il nostro studio evidenzia come la TP sia sovra-espressa nei tumori maligni della mammella del cane e, come nel tumore della mammella della donna (1-4), la sovraespressione venga evidenziata nelle cellule epiteliali. Questo dato indicherebbe un ruolo della TP nella cinetica proliferativa e nella patogenesi delle neoplasie mammarie del

cane poichè aumenterebbe la disponibilità del "pool" delle pirimidine.

Sotto il profilo clinico patologico sarà interessante esplorare, in una casistica più numerosa, il ruolo della TP in relazione al grado di progressione della neoplasia, alla dimensione del tumore (T), al grado di coinvolgimento linfonodale (N), al grado di differenziazione della neoplasia (G), alla presenza o meno di metastasi a distanza, al tipo di risposta o meno ad eventuali trattamenti chemioterapici.

Daltro canto, poichè la timidina fosforilasi è un enzima che a mezzo del suo metabolita, il desossiglucosio, è in grado di stimolare il processo angiogenetico, è possibile ipotizzare una neoangiogenesi anche nei tumori del cane.

Il nostro studio ha per la prima volta messo in evidenza come la TP sia sovra-espressa nei tumori maligni della mammella del cane. Sarebbe di estremo interesse analizzare sotto il profilo immunistoichimico la densità microvasale (MVD) e le correlazioni con la TP. Sotto il profilo terapeutico ciò potrebbe tradursi con l'utilizzo, nelle neoplasie del cane, degli inibitori dell'angiogenesi. Ricerche appropriate potrebbero chiarire, sulla scorta della espressione enzimatica della TP, il ruolo di questo enzima in relazione alla prognosi e al carattere di invasività della neoplasia.

BIBLIOGRAFIA

1. Andrew H. S., Edwin L., Dublin A. and Borrow L.J.: Angiogenesis and expression of thymidine phosphorylase by inflammatory and carcinoma cells in ductal carcinoma in situ of the breast. *The Journal of Pathology*, 1999, 187, 285-290.
2. Akiyama S., Furukawa T., Sumizawa T., Takebayashi Y., Nakajima Y., Shimaoka S. and Haraguchi M.: The role of thymidine phosphorylase, an angiogenic enzyme, in tumour progression. *Cancer Science*, 2004, 95, 11, 851-857.
3. Brown N. S. and Bicknell R.: Thymidine phosphorylase, 2-deoxy-d-ribose and angiogenesis. *The Biochemical Journal*, 1998, 334, 1-8.
4. Kobayashi M., Sugimoto T., Okabayashi T., Okamoto K., Namikawa T., Tochika N., Moriki T., Araki K.: Localisation of thymidine phosphorylase in breast cancer tissue. *Medical molecular morphology*, 2005, 38(2), 112-117.

5. Ranieri G., Patruno R., Fiore G., Saponaro G., Paradiso A., Grammatica L.: Thymidine Phosphorylase over-expression in oral squamous carcinoma tissue as a potential target of capecitabine. *Letter in Drug Design e Discovery*, 2004, 1, 1-5.
6. Siviridis E., Giatromanolaki A., Papadopoulos I., Gatter K.C., Harris A.L. and Loukourakis M.I.: Thymidine phosphorylase expression in normal hyperplastic and neoplastic prostates: correlation with tumour associated macrophages, infiltrating lymphocytes and angiogenesis. *British Journal of Cancer*, 2002, 86,1465-1471.

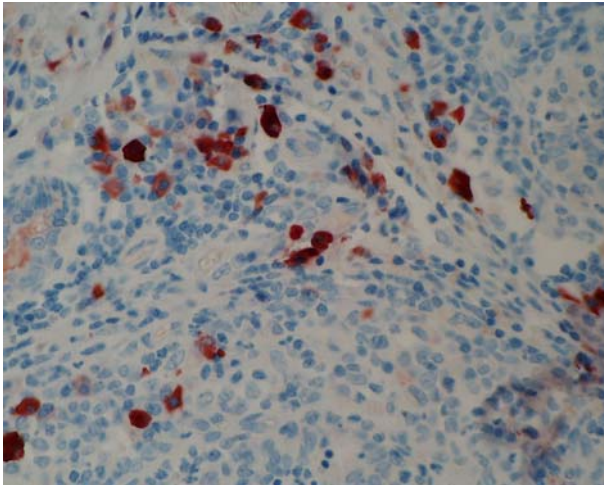


Figura 1. Cellule epiteliali con nuclei positivi alla reazione immunostochimica TP. Fibroblasti e macrofagi debolmente colorati.

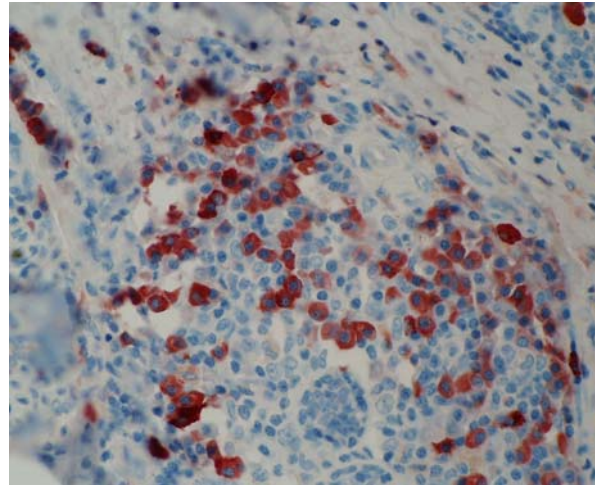


Figura 2. Cellule epiteliali con nuclei positivi alla reazione immunostochimica TP. Fibroblasti e macrofagi debolmente colorati.

EXPRESSION OF THYMIDINE PHOSPHORYLASE IN MAMMARY TUMOURS OF THE DOG

Thymidine phosphorylase (TP), an enzyme involved in pyrimidine metabolism, is identical to platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF). TP results phylogenetically preserved from unicellular prokaryote organism (*E. coli*, *Salmonella* spp.) to man. The angiogenic activity of TP has been examined in several recent studies on human malign tumours, showing a TP overexpression in carcinomas of liver, stomach, udder and prostate. This overexpression is directly related to tumour growth and malignity. However, TP expression and correlation with neoplastic progression have not been yet investigated in animals. For this purpose, we focused our attention on the study of TP in the spontaneous model of canine mammary neoplasies.

In order to evaluate the expression of TP, fifteen mammary tumours, classified as tubular and papillar adenocarcinomas, according to Hampe and Misdorp (*Bulletin of World Health Organization*, 1974, 50,111-133), and adjacent non-neoplastic tissues were examined. Fixed tissues were processed for immunohistochemical analysis (avidin-biotin method) using a monoclonal antibody against TP, PD-ECGF ab1(clone PGF44.c). In neoplastic tissues the epithelial cells showed immunoreactivity with a percentage ranging from 10 to 90%, while non-neoplastic cells resulted negative. Other positive cellular populations were identified consisting of macrophages and fibroblasts.

Our data suggest that the TP is expressed in mammary malignant tumours of the dog suggesting that it may play a role in the cancerogenesis and tumoral progression of canine neoplasies.

Keywords: Thymidine phosphorylase, mammary tumour, dog

RISULTATI DEFINITIVI DEL PROGETTO DI RICERCA SULL'ENCEFALOPATIA SPONGIFORME FELINA

Iulini Barbara, Porcario Chiara, Perazzini Alice Zaira, Castagnaro Massimo*, Mandara Maria Teresa, Ligios Ciriaco[§], Loria Ruggero Guido^{§§}, Cantile Carlo[‡], Caramelli Maria, Casalone Cristina**

*CEA – Istituto Zooprofilattico Sperimentale (IZS) del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta
Facoltà di Medicina Veterinaria di Padova* - Facoltà di Medicina Veterinaria di Perugia**
IZS della Sardegna, Sassari[§] - IZS della Sicilia, Palermo^{§§} - Facoltà di Medicina Veterinaria di Pisa[‡]*

L'encefalopatia spongiforme felina (FSE) è un'encefalopatia spongiforme trasmissibile caratterizzata dall'accumulo dell'isoforma patologica della proteina prionica (PrPsc) nel sistema nervoso centrale.

Dopo il primo caso di FSE, scoperto in Inghilterra nel 1990, la maggior parte dei casi sono stati riscontrati in Gran Bretagna, tuttavia alcuni sono stati rinvenuti anche nel resto d'Europa.

La malattia si presenta con anomalie comportamentali e incoordinazione dei movimenti, sintomi non patognomonic, ma progressivi e fatali. La causa è imputabile all'alimentazione con carni contaminate dall'agente eziologico della BSE.

L'attuazione di un sistema di sorveglianza per l'FSE è stata considerata dal Ministero della Salute come un utile strumento epidemiologico nella valutazione del rischio BSE in Italia. A tal fine è stato finanziato questo progetto di ricerca volto a rilevare eventuali casi di FSE sul territorio.

Nell'arco di due anni (2003 - 2005) 110 cervelli di gatti con sintomatologia nervosa sono stati sottoposti a esami istologici e immunoistochimici per evidenziare la PrPsc.

Nessun caso di FSE è stato diagnosticato.

Questa ricerca, tuttavia, rappresenta un vasto e accurato monitoraggio prima mai svolto sulle patologie neurologiche feline. Le lesioni istologiche riscontrate sono state così classificate: neoplasie 22%, encefaliti granulomatose 15%, encefalopatie tossico-metaboliche 13%, lesioni degenerative 9 %, encefaliti suppurative 5%, lesioni traumatiche 4%, alterazioni di circolo 4%, encefaliti non suppurative 3%. Il 20% dei campioni testati non ha presentato lesioni istologiche e il 5% è risultato non idoneo.

Parole chiave: proteina prionica, encefalopatia spongiforme felina, sorveglianza

FINAL RESULTS OF PROJECT ON FELINE SPONGIFORM ENCEPHALOPATHY

Feline spongiform encephalopathy (FSE) is a transmissible spongiform encephalopathy associated with the accumulation of an abnormal isoform of the prion protein (PrPsc) in the Central Nervous System.

The first FSE case was detected in England in 1990 and since then the majority of positive cats were discovered in Great Britain, but other cases were found out elsewhere in Europe too.

The illness is characterised by progressive and invariably fatal nervous signs, including behavioural changes and movement disorders, not easily distinguishable from other feline neurological conditions. The disease is associated with the consumption of food contaminated by the agent of BSE.

The detection of FSE in Italy can be useful for a further comprehension of BSE epidemiology in our country. For this reason the Italian Ministry of Health granted this research project on surveillance and identification of FSE cases in Italy.

During a period of two years (2003 – 2005), 110 brains from cats showing neurological symptoms underwent histological examination to detect neuropil spongiosis and immunohistochemical investigations to evaluate PrPsc.

No evidence of FSE was proved for any of the samples tested.

This research, however, allowed to identify other neurological diseases affecting the Italian cat population. The differential diagnosis were classified as: neoplasia 22%, granulomatous encephalitis 15%, toxic-metabolic encephalopathy 13%, degenerative lesions 9 %, suppurative encephalitis 5%, traumatic lesions 4%, circulatory disorders 4%, non suppurative encephalitis 3%.

No histological lesions were found in 20% of the samples tested and the unsuitable ones were 5%.

Keywords: prion protein, feline spongiform encephalopathy, surveillance

MENINGOENCEFALITE GRANULOMATOSA DA PROTOTHECA IN UN CANE

Salvadori Claudia, Mandrioli Luciana,* Giuliano Bettini, * Arispici Mario, Cantile Carlo

Dipartimento di Patologia Animale, Profilassi e Igiene degli Alimenti - Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Pisa; * Servizio di Anatomia Patologica - Dipartimento di Sanità Pubblica Animale e Patologia Animale- Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Bologna

Sono descritte le caratteristiche clinico-patologiche di un caso di prototecosi coinvolgente il SNC in un cane da Pastore Maremmano-Abruzzese maschio di 3 anni che era stato presentato con una anamnesi di depressione, movimenti in circolo e tetraparesi che progredirono fino a decubito laterale con pleurotono. All'esame macroscopico del SNC erano evidenti focolai necrotizzanti multifocali a livello del talamo e del tronco encefalico. Le lesioni istopatologiche erano caratterizzate da meningoencefalite granulomatosa multifocale con presenza di numerosi macrofagi, linfociti, plasmacellule e rari eosinofili. I granulomi erano presenti soprattutto a livello di talamo, ippocampo e tronco encefalico caudale, coinvolgevano la sostanza bianca, la sostanza grigia e le meningi ed erano associati a demielinizzazione, degenerazione assonale, gliosi e malacia. A livello dei nervi ottici era evidente neurite periassiale ed assiale multifocale associata ad atrofia segmentale e fibrosi. Nei focolai granulomatosi dell'encefalo e a livello delle meningi erano evidenti numerosi organismi ovali-rotondeggianti non pigmentati, di circa 6 x 15 µm con una spessa parete PAS e GMS positiva, compatibili con alghe del genere *Prototheca* spp. (famiglia *Chlorellaceae*). Erano evidenti anche organismi sporulanti con 2-4 endospore. Tramite esame ultrastrutturale numerosi organismi singoli e multipli erano presenti soprattutto all'interno dei macrofagi. Questi organismi apparivano degenerati con perdita del nucleo, dei granuli di amido, dei corpi densi e con una membrana plasmatica irregolare. In letteratura sono descritti casi sporadici di prototecosi a carico del SNC nel cane, ma questa infezione dovrebbe essere considerata nella diagnostica differenziale in caso di sindrome neurologica multifocale anche in Italia.

Parole chiave: cane, prototecosi, patologie infiammatorie, sistema nervoso centrale.

INTRODUZIONE

La prototecosi è una rara infezione nell'uomo e negli animali causata da alghe del genere *Prototheca* appartenenti alla famiglia *Chlorellaceae* (Hollingsworth, 2000). La *Prototheca*, un'alga saprofitica che non contiene clorofilla, è considerata ubiquitaria nell'ambiente ed è stata isolata dal terreno, dall'acqua dolce e salata, dalle feci di animali e dalla linfa delle piante (Blogg *et al.*, 1995; Hosaka *et al.*, 2004). La riproduzione avviene asessualmente per divisione della cellula madre (endosporulazione) in 2-20 cellule figlie, o endospore, che vengono rilasciate a seguito della rottura della cellula madre (Hollingsworth, 2000). Le specie *Prototheca zopfii* e *Prototheca wickerhamii* sono riconosciute specie patogene per il cane (Hosaka *et al.*, 2004).

Lo scopo del presente lavoro è di descrivere le caratteristiche clinico-patologiche di un caso di prototecosi coinvolgente il sistema nervoso centrale (SNC) in un cane.

MATERIALI E METODI

Un cane maschio di 3 anni di razza Pastore Maremmano-Abruzzese era stato presentato con un'anamnesi di depressione, movimenti in circolo verso destra, ipometria e tetraparesi da circa 2 mesi. I sintomi erano progrediti fino a decubito laterale con pleurotono destro.

L'encefalo era stato fissato in formalina tamponata al 10%, sezioni coronali erano state incluse in paraffina e sezionate in sezioni di 5µm come di routine. Le sezioni erano state colorate con ematossilina-eosina, PAS, Luxol Fast Blue, Mucicarminio e Gomori Methenamine Silver (GMS). Aree selezionate dell'encefalo erano state post-fissate in tetrossido d'osmio e incluse in resina epossidica dopo disidratazione con alcool a concentrazioni crescenti. Sezioni ultrafini erano state contrastate con citrato di piombo e acetato di uranile.

RISULTATI

Aspetti clinici

All'esame obiettivo generale era evidente uno scadente stato di nutrizione. All'esame neurologico il cane mostrava grave depressione, gravi deficit propriocettivi sui quattro arti, diminuzione del riflesso flessorio anteriore bilateralmente, deficit della reazione alla minaccia, miosi, cecità con assenza del nistagmo fisiologico e deficit del nervo facciale. I sintomi erano indicativi di una localizzazione intracranica multifocale. Le caratteristiche cliniche della sintomatologia erano compatibili con una patologia infiammatoria o neoplastica. Considerando la prognosi infausta il proprietario decise di effettuare l'eutanasia rifiutando l'esecuzione di ulteriori esami collaterali.

Aspetti neuropatologici

All'esame macroscopico dell'encefalo erano evidenti focolai malacici multifocali a livello del talamo e del tronco encefalico. Le lesioni istologiche erano caratterizzate da meningoencefalite granulomatosa multifocale con presenza di numerosi macrofagi, linfociti, plasmacellule e rari eosinofili (Fig. 1). I granulomi erano presenti soprattutto a livello di talamo, ippocampo e tronco encefalico caudale, coinvolgevano la sostanza bianca, la sostanza grigia e le meningi ed erano associati a demielinizzazione con edema e disintegrazione della guaina mielinica, rigonfiamento e degenerazione assonale, gliosi e malacia. A livello dei nervi ottici era evidente neurite periaassiale ed assiale multifocale con infiltrati infiammatori costituiti prevalentemente da linfociti, plasmacellule e rari neutrofili non degenerati associata ad atrofia segmentale e fibrosi (Fig. 2). Nei focolai granulomatosi encefalici e meningei erano evidenti numerosi organismi ovali-rotondeggianti, non pigmentati, di circa 6x15 µm, con citoplasma debolmente eosinofilo, nucleo basofilo centrale e con una spessa parete Mucicarminio negativa, PAS e GMS positiva, compatibili con alghe del genere *Prototheca* spp. (Fig. 3). Erano evidenti anche organismi sporulanti contenenti 2-4 endospore e sferule collassate vuote. All'esame ultrastrutturale numerose alghe singole e multiple erano presenti soprattutto all'interno

dei macrofagi. Le alghe apparivano degenerate con perdita del nucleo, dei granuli di amido, dei corpi densi e con una parete cellulare irregolare.

DISCUSSIONE

Le gravi lesioni infiammatorie di natura granulomatosa a livello del SNC con distribuzione multifocale erano compatibili con la localizzazione clinica della sintomatologia. Tetraparesi, movimenti compulsivi, deficit propriocettivi e cecità sono segni clinici descritti anche in altri casi di prototecosi canina coinvolgenti il SNC (Tyler *et al.*, 1980; Thomas *et al.*, 1990). Generalmente l'infezione si presenta con sintomi gastroenterici quali diarrea emorragica cronica e segni oftalmologici quali cecità con glaucoma e distacco di retina. Sono anche descritti casi di prototecosi generalizzata con lesioni a carico di miocardio, rene, muscoli, tiroide e pancreas (Hollingsworth *et al.*, 2000; Tyler *et al.*, 1980; Shultze *et al.*, 1998). Le lesioni sono caratterizzate sempre da infiammazione di tipo granulomatosa multifocale (Hosaka *et al.*, 2004). Nelle infezioni generalizzate si ipotizza che l'infezione avvenga per via orale con lesioni intestinali e successiva diffusione ematogena e linfatica (Hollingsworth *et al.*, 2000; Rallis *et al.*, 2002). Le infezioni sistemiche sono generalmente conseguenti a stati di immunodepressione o deficit del sistema immunitario e i cani di razza Pastore Scozzese sembrano essere predisposti all'infezione (Hollingsworth *et al.*, 2000; Rakich *et al.*, 1984; Cheville *et al.*, 1984; Shultze *et al.*, 1998). La localizzazione delle alghe all'interno dei macrofagi è tipica delle infezioni da *Prototheca* spp. e la presenza di numerose forme algali degenerate all'interno dei macrofagi caratterizza le infezioni croniche. I macrofagi infatti non riescono a distruggere completamente la parete cellulare in quanto estremamente enzima-resistente per la presenza di sporopollenina, un complesso di polimeri di carotenoidi o esteri di carotenoidi ossidati. I macrofagi comunque inibiscono il ciclo replicativo delle alghe digerendo completamente gli organelli interni (Cheville *et al.*, 1984). Le colorazioni quali PAS, Mucicarminio e GMS risultano utili nella

diagnostica differenziale in casi di prototecosi soprattutto per la differenziazione con *Criptococcus neoformans* e alghe del genere *Chlorellae*. *Criptococcus neoformans* presenta una spessa capsula di eteropolisaccaridi positiva al Mucicarminio, mentre le alghe appartenenti al genere *Chlorellae* sono alghe verdi contenenti clorofilla e mostrano abbondanti granuli citoplasmatici PAS e GMS positivi (Rallis *et al.*, 2002; Summers *et al.*, 1995). Infezioni da alghe del genere *Chlorellae* non sono comunque riportate nel cane (Rallis *et al.*, 2002).

CONCLUSIONE

Le descrizioni da infezione da *Prototheca* spp. nel cane sono sporadiche, ma hanno una distribuzione mondiale con casi descritti in Africa, Asia, Europa, Nord America e Oceania (Hollingsworth *et al.*, 2000; Tyler *et al.*, 1980). Anche in Italia la Prototecosi deve essere posta tra le diagnosi differenziali in cani con sintomatologia neurologica a localizzazione multifocale.

BIBLIOGRAFIA

1. Blogg JR, Sykes JE (1995) Sudden blindness associated with protothecosis in a dog. *Aust Vet J*, 4, 147-149.
2. Cheville NF, McDonald J, Richard J (1984) Ultrastructure of *Prototheca zopfii* in bovine granulomatous mastitis. *Vet Pathol*, 21, 341-348.
3. Hollingsworth SR (2000) Canine protothecosis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 5, 1091-1101.
4. Hosaka S, Hosaka M (2004) A case of canine protothecosis. *J Vet Med Sci*, 66, 593-597.
5. Rakich PM, Latimer KS (1984) Altered immune function in a dog with disseminated protothecosis. *J Am Vet Med Assoc*, 1984, 185, 681-683.
6. Rallis TS, Tontis D, Adamama-Moraitou KK, Mylonakis ME, Papazoglou LG (2002) Protothecal colitis in a German Shepherd dog. *Aust Vet J*, 7, 406-408.
7. Schultze AE, Ring RD, Morgan RV, Patton CS (1998) Clinical, cytologic and histopathologic manifestations of protothecosis in two dogs. *Vet Ophthalmol*, 1, 239-243.
8. Summers BA, Cummings JF, de Lahunta A (1995) *Veterinary Neuropathology*. Mosby-Year Book Inc., St. Louis, Missouri. pp. 151-153.
9. Thomas JB, Preston N (1990) Generalised protothecosis in a Collie dog. *Aust Vet J*, 1, 25-27.
10. Tyler DE, Lorenz MD, Blue JL, Munnell JF, Chandler FW (1980) Disseminated protothecosis with central nervous system involvement in a dog. *J Am Vet Med Assoc*, 10, 987-993.

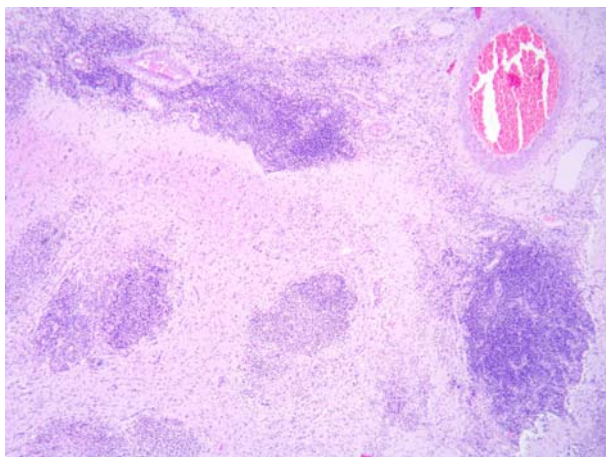


Figura 1. Talamo. Le lesioni granulomateuse hanno una distribuzione multifocale-coalescente, talvolta perivascolare, e sono formate da numerosi macrofagi, linfociti e plasmacellule. E-E; 40X.

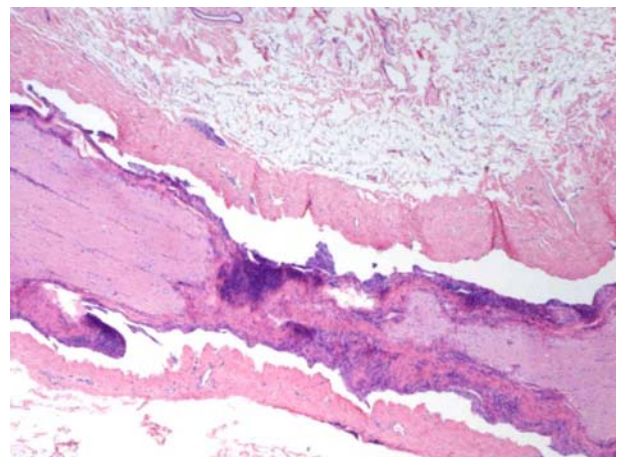


Figura 2. Nervo ottico. Le meningi mostrano infiltrazione di numerosi linfociti e plasmacellule con fibrosi. Focalmente l'endonevrio appare infiltrato da cellule infiammatorie e fibrotico. E-E; 40X.

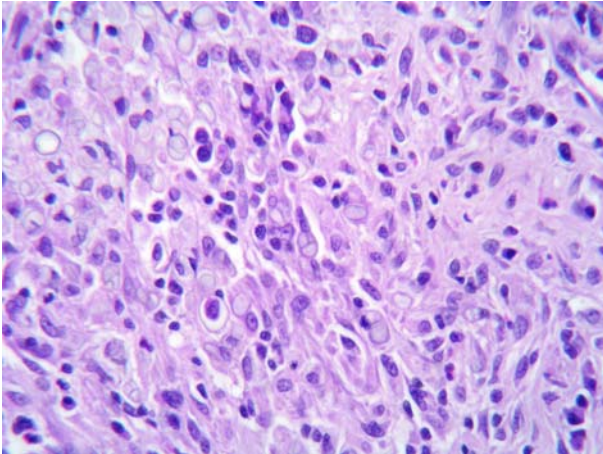


Figura 3. Talamo. Sono evidenti numerosi organismi rotondo-ovalari provvisti di capsula e talvolta di nucleo. Si osservano anche organismi sporulanti contenenti 2-4 endospore (freccie). E-E; 125X.

PROTOTHICAL GRANULOMATOUS MENINGOENCEPHALITIS IN A DOG

Clinical and pathological features of a CNS protothecosis in a dog are described. A 3-year-old male Maremma Sheepdog was presented because of progressive neurological dysfunction with depression, circling, tetraparesis progressing to lateral recumbency and pleurothotonus. Gross pathological findings were multifocal necrotizing foci in the thalamus and brainstem and histopathological feature was a multifocal granulomatous meningoencephalitis with numerous macrophages, lymphocytes, plasmacells and rare eosinophils. Granulomas were scattered in the white and gray matter and meninges especially of the thalamus, hippocampus and caudal brainstem associated with demyelination, axonal degeneration, gliosis and malacia. A multifocal periaxial and axial inflammation of the optic nerves associated with segmental atrophy and fibrosis were also evident. In the granulomatous foci and in the meninges myriads of nonpigmented oval-rounded, approximately 6 x 15 µm organisms with thick PAS and GMS (Gomori Methenamine Silver) positive wall suggestive of *Prototheca* spp. (family *Chlorellaceae*) were observed. Sometimes sporulating protothecal cells containing 2-4 endospores were present. Ultrastructural examination revealed many multiple or single algae organisms especially within macrophages. Organisms were degenerated sometimes with loss of nucleus, starch granules and dense bodies with an irregular plasma membrane. Sporadic reports of CNS protothecosis were described in dogs. Protothecosis should be included in the differential diagnosis of multifocal neurologic syndromes in dogs also in Italy.

Key words: dog, protothecosis, inflammatory diseases, central nervous system.

INFEZIONE SPERIMENTALE CON *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* NELLA LEPRE

Verin Ranieri¹, Ambrogio Cecilia², Fratini Filippo¹, Ebani Valentina Virginia¹, Ragagli Charlotte², Poli Alessandro¹

¹Dipartimento di Patologia Animale, Profilassi e Igiene degli Alimenti, Università di Pisa.

²Corpo Forestale dello Stato, Ufficio Territoriale per la Biodiversità, Via Giusti 36 Lucca.

La pseudotubercolosi è una malattia infettiva contagiosa frequente nella lepre, sostenuta da *Yersinia pseudotuberculosis*. Allo scopo di caratterizzare l'evoluzione della malattia e le lesioni indotte dal batterio, sono state infettate, per via orale ed endocongiuntivale, alcune lepri adulte: sei con un ceppo di *Y. pseudotuberculosis* isolato dalla lepre e cinque con un ceppo isolato dal coniglio. Due animali sono stati utilizzati come controlli negativi. Tutti gli animali sono stati sottoposti ad esami clinici a cadenza regolare per 66 giorni. Cinque animali sono deceduti nel periodo di osservazione: tre infettati con ceppo lepre (al 12°, 16° e 38° giorno p.i.) e due con ceppo coniglio (al 21° e 38° giorno p.i.). Da tali soggetti è stato possibile l'isolamento di *Y. pseudotuberculosis* dagli organi tramite esami culturali. Lesioni caratteristiche sono state evidenziate nel rene, fegato, milza, linfonodi sottomandibolari e polmoni. Nei soggetti infettati per via orale è stato possibile osservare anche lesioni microscopiche a carico dell'intestino e dei linfonodi meseraici. Il ceppo lepre si è dimostrato maggiormente virulento. Le lesioni intestinali sono apparse strettamente dipendenti dalla via di contagio, risultando presenti solo nei soggetti infettati per via orale. Le indagini immunostochimiche hanno evidenziato la presenza dell'antigene batterico nelle cellule fagocitarie poste alla periferia delle lesioni. L'immunostochimica inoltre è risultata una valida metodica da affiancare alle indagini autoptiche, batteriologiche ed istopatologiche per la diagnosi post-mortem di pseudotubercolosi nella lepre.

Parole chiave: immunostochimica, lepre, patologia, *Yersinia pseudotuberculosis*

EXPERIMENTAL INFECTION BY *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* IN HARE

The pseudotuberculosis is a wide spread infectious disease of hare, caused by *Yersinia pseudotuberculosis*. Eleven adult hares have been infected “per os” and endoconjunctivally to characterize the clinical and pathological alterations in this species. Six hares were infected with a hare strain of *Y. pseudotuberculosis* while five animals were infected with a strain isolated from the rabbit. Two hares were used as negative controls. All the animals were periodically submitted to a 66-day follow-up. Five animals died during the observation period: 3 of these were infected with the hare strain (at 12th, 16^h e 38th day p.i.) and 2 with the rabbit strain (at 21th e 38th day p.i.). *Y. pseudotuberculosis* was isolated from different organs by bacteriological exams. Lesions were found in liver, spleen, mandibular lymph nodes, lungs and kidney. Microscopic lesions related with *Yersinia* infection were found in the intestine and meseraic lymph nodes in the subjects infected “per os”. The strain isolated from the hare demonstrated to be more virulent than the rabbit strain and intestinal lesions appeared to be strictly related with alimentary infection. By immunohistochemistry bacterial antigens were localized within phagocytic cells scattered at the lesion edge. Immunohistochemistry appeared to be a reliable test in addition to the routine methods for post-mortem diagnosis of pseudotuberculosis in hare.

Keywords: hare, immunohistochemistry, pathology, *Yersinia pseudotuberculosis*

UN CASO DI CEFALOTORACOPAGIA (*Octopus biauritus*) NELL'AGNELLO

Bettini Giuliano, Sarli Giuseppe, Bacci Barbara, Marcato Paolo Stefano

Università di Bologna, Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale

La cefalotoracopagia è una rara forma di mostruosità doppia, in cui i gemelli si presentano congiunti a livello di testa, collo e torace; colonna vertebrale, arti e pelvi sono invece separati e gli organi interni possono presentare gradi variabili di duplicazione. Il caso presentato riguarda un agnello maschio nato morto, che presentava una testa apparentemente normoconformata (una sola faccia) ma con cranioschisi e palatoschisi, un collo, due toraci fusi, due colonne vertebrali, due addomi, otto arti e due code (cefalotoracopago deradelfo). Gli organi interni erano rappresentati da un cuore, quattro polmoni, un condotto tracheo-esofageo abortivo, un fegato, due tubi gastrointestinali completi, due milze, quattro testicoli, quattro reni e due vesciche. Il caso viene confrontato con mostruosità simili archiviate nel nostro museo di Patologia e Teratologia Veterinaria dal 1800.

Parole chiave: cefalotoracopago, *Octopus*, gemelli congiunti, teratologia, ovini

INTRODUZIONE

In teratologia i gemelli congiunti simmetrici sono distinti secondo il punto di fusione in craniopagi (uniti tramite il cranio), toracopagi (uniti per il torace), onfalopagi (uniti anteriormente per l'addome), pigopagi (uniti posteriormente a livello del sacro) ed ischiopagi (uniti nella regione pelvica) (1,5,6). La simultanea fusione per testa e torace è detta cefalotoracopagia è rara e ne esistono poche descrizioni dettagliate; nella letteratura veterinaria i mostri cefalotoracopagi sono anche ricordati nella classificazione di Gurlt (1831) come *Octopus* (4).

I cefalotoracopagi sono a loro volta distinti in tre tipi: a) cefalotoracopago janiceps (*Octopus janus*), che presenta facce complete su lati opposti della testa (il nome deriva da Janus, il dio romano delle porte e dei cancelli, raffigurato con due teste, una volta verso il passato e l'altra verso il futuro); b) cefalotoracopago sincefalo o iniope (*Octopus quadriauritus*), in cui una delle due facce è meno sviluppata e spesso rappresentata solo dalle orecchie; c) cefalotoracopago deradelfo (*Octopus biauritus*) con una sola faccia ben sviluppata (1,4,5,6). Si descrive un caso di malformazione di questo ultimo tipo osservata in un agnello, confrontando i reperti con casi simili conservati nel Museo di Anatomia Patologica e Teratologia Veterinaria della facoltà di Medicina Veterinaria di Bologna.

DESCRIZIONE DEL CASO

Il caso presentato riguarda un agnello cefalotoracopago deradelfo maschio nato morto a termine con parto spontaneo eutocico. All'esame esterno il soggetto si presentava come mostruosità doppia caratterizzata da una testa unica grossolanamente normoconformata, due tronchi fusi a livello di torace, 8 arti e 2 code (fig. 1). La testa presentava palatoschisi e cranioschisi con parziale erniazione della massa cerebrale (meningoencefalocele); la unica cavità cranica conteneva un cervello e un cervelletto ed era articolata a livello occipitale a due distinte colonne vertebrali contenute a livello cervicale in un unico collo, così che il sistema nervoso centrale si duplicava dopo il midollo allungato in due distinti midolli spinali (fig. 2).

La parziale fusione di due toraci originava un'unica ampia gabbia toracica, su cui si inserivano due distinti cinti scapolari, che proseguiva, caudalmente all'inserzione di due distinti cordoni ombelicali, in due addomi ognuno con cinto pelvico e coda completi. Gli 8 arti erano normoconformati, pur se i posteriori mostravano iperflessione e scarsa estensibilità. All'apertura delle cavità addominali, distinte nella loro porzione medio-posteriore, se ne rilevava la confluenza in un'unica cavità splancnica (fig. 3) che conteneva due distinti tubi gastro-intestinali completi (fig. 4A) ed un'unica voluminosa massa epatica la cui forma ne suggeriva la derivazione dalla fusione mediale di due organi

distinti (fig. 4B) ed in cui convergevano le vene ombelicali di ogni lato. Si osservavano due milze, quattro reni, quattro testicoli e due vesciche. Nella cavità toracica erano contenuti 4 distinti polmoni ed un unico cuore. I polmoni apparivano atelettasici e privi di un evidente albero bronchiale, in quanto trachea ed esofago erano fusi in un unico tubo mediale dotato di irregolari abbozzi cartilaginei che si biforcava a livello dei prestomaci (fig. 4C). A livello cardiaco si rilevava che dalle cavità ventricolari, ampiamente comunicanti per la presenza di un ampio difetto settale, originavano due distinte aorte; era presente una unica cavità atriale in cui si immettevano le vene cave, mentre erano assenti le arterie polmonari (fig. 4D).

I caratteri macroscopici del caso sono stati confrontati con quelli dei preparati conservati nel Museo di Anatomia Patologica e Teratologia Veterinaria del Dipartimento (scheletri, visceri in formalina, disegni e cere) relativi ad altri casi di cefalotoracopagi (4 ovini, 3 bovini, 4 suini e 5 gatti) raccolti dai primi anni del 1800 (figg. 5 e 6). Nei casi esaminati è stato possibile rilevare vari gradi di duplicazione degli organi interni; polmoni, milza, pancreas ed organi genitali si sono mostrati costantemente doppi.

DISCUSSIONE

Casi di gemelli congiunti sono stati descritti in tutte le specie domestiche, con incidenza maggiore nel bovino (1,5). Nell'agnello i gemelli congiunti rappresentano circa il 2% delle malformazioni neonatali (3) e non sono riportate predisposizioni di sesso, mentre nell'uomo casi di gemelli congiunti sono più frequenti nella femmina (6). Nella maggior parte dei casi segnalati, le mostruosità doppie simmetriche riguardano nella specie ovina un difetto di duplicazione a carico della regione posteriore, mentre nella specie bovina sono più frequenti i difetti anteriori (5). Fra le varie tipologie di gemellarità congiunte osservabili, la cefalotoracopagia (fusione completa di testa, collo e torace con duplicazione simmetrica del tronco) è quella osservata meno frequentemente in tutte le specie animali e nell'uomo (5); il suino è l'unica specie in cui questa malformazione è riferita come piuttosto

comune (5,9). Nell'agnello risultano in particolare descritti pochissimi casi di cefalotoracopagia, in cui la testa presentava gradi variabili di duplicazione (2,7,8).

Il meccanismo di sviluppo dei gemelli congiunti non è stato ancora del tutto chiarito. È tuttavia comunemente accettato che tali malformazioni derivino da una divisione incompleta o tardiva del disco embrionale di gemelli monozigoti (teoria della *fissione*) mentre è ormai abbandonata la teoria della possibile origine dei gemelli congiunti dall'unione di due embrioni inizialmente distinti, nel corso delle primissime fasi dello sviluppo embrionale (teoria della *fusione*). Secondo le teorie più recenti se la duplicazione dell'embrione avviene allo stadio di morula (entro 3-4 giorni dal concepimento nell'uomo), le cellule dell'embrione non si sono ancora differenziate, e i gemelli avranno ciascuno una propria placenta e una propria membrana amnio-coriale (*gemelli monozigoti bicoriali biamniotici*). Se la duplicazione dell'embrione avviene allo stadio di blastocisti (tra 3 e 9 giorni dal concepimento) le cellule destinate a formare la placenta sono già ben differenziate e i due gemelli condivideranno la stessa placenta, ciascuno in una propria cavità amniotica (*gemelli monozigoti monocoriali biamniotici*). Se la duplicazione avviene più tardivamente ma comunque entro il 12°-13° giorno (stadio della linea primitiva), anche le cellule che formano l'amnios si sono differenziate, e i due gemelli, oltre a condividere la stessa placenta, saranno contenuti all'interno di una stessa cavità amniotica (*gemelli monocoriali monoamniotici*). Se infine la duplicazione avviene oltre il 13°-14° giorno dal concepimento (stadio del disco embrionale), le cellule fetali sono già parzialmente differenziate e la separazione sarà solo parziale, con il risultato di due gemelli incompletamente divisi che per definizione sono anche monocoriali e monoamniotici (*gemelli siamesi o congiunti*). Da un punto di vista eziologico le cause in grado di indurre duplicazione dell'embrione possono essere diverse anche se nella maggior parte dei casi non è possibile identificare una causa specifica. Oltre alla predisposizione su base genetica, è stato ipotizzato, e talora dimostrato in studi sperimentali, il possibile ruolo di cause

meccaniche, fisiche (esposizione a radiazioni ionizzanti), chimiche (etanolo, vincristina, anestetici locali e generali, colchicina, acetaldeide), ambientali ed alimentari (diete povere quali- e quantitativamente) (5). Il relativamente elevato numero di mostri cefalotoracopagi conservati nel nostro museo, confrontato con l'esiguo numero di segnalazioni della stessa malformazione nella letteratura scientifica recente, suggerisce come nel passato queste anomalie fossero più frequenti, verosimilmente in relazione alle precarie condizioni igieniche ed alimentari del tempo.

I gemelli congiunti cefalotoracopagi, oltre alle più evidenti anomalie scheletriche, presentano malformazioni degli organi interni incompatibili alla vita. Le anomalie più spesso riscontrate negli animali e nell'uomo sono localizzate lungo la linea mediana e testimoniano la difettosa duplicazione longitudinale dell'embrione (5,6). Nella testa possono essere presenti palatoschisi, cranioschisi, labbro leporino, ciclopia (le prime due presenti anche nel nostro caso); a livello di apparato digerente e respiratorio è spesso rilevabile un'anomala differenziazione del setto esofago-tracheale, che nel nostro caso aveva portato alla formazione di un unico canale esofago-tracheale; il fegato è solitamente unico ma di doppie dimensioni, come anche da noi osservato; l'intestino può presentare vari gradi di duplicazione (nel nostro caso la duplicazione era completa dagli stomaci in poi); cuore e polmoni possono essere singoli o doppi e mostrano costantemente gravi anomalie vascolari; gli apparati urinario e genitale presentano organi in numero doppio ed apparentemente

normoconformati. Le stesse anomalie sono state anche riscontrate nei preparati e nelle descrizioni relative ai casi di cefalotoracopagi conservati nel nostro Museo di Anatomia Patologica e Teratologia Veterinaria che, oltre che pregevole collezione di vere opere d'arte, si conferma come raccolta di prezioso valore scientifico.

BIBLIOGRAFIA

1. Arthur, G.H. (1956): Conjoined twins- the veterinary aspects. *Vet. Rec.* 68, 389-393.
2. Cazabon, E.P.I., Adogwa, A.O. (2003). A case of cephalothoracopagus in sheep in Trinidad and Tobago. *Can Vet J* 44:56-58.
3. Dennis SM (1975) Embryonic duplications in sheep. *Austr Vet J* 51:83-87.
4. Gurlt EF (1831) *Lehrbuch der pathologischen Anatomie der Haussäugethiere nebst einem Anhang, welcher die Beschreibung der bei den Haussäugethiere vorkommenden Eingeweidewürmer enthält.* Berlin.
5. Hiraga T, Tennis SM (1993). Congenital duplications. *Vet Clin North Am* 9(1):145-161.
6. Kaufman, M.H. (2004): The embryology of conjoined twins. *Childs Nerv Syst* 20:508-525
7. Mitra M, Basak, DN, Chakrabarti A (1994) Monocephalus thoracopagus tetrapus tetranrachius monster in a Black Bengal goat. *Indian Vet J* 71:177-178
8. Ramesh BK, Vedamurthy CB (2005) Diplopagus thoracopagus tetrabrachius tetrapus monster in a sheep. *Indian Vet J* 82:319-320.
9. Selby LA, Edmonds LD, Parke DW, Stewart RW, Marienfeld CJ (1973) Use of Mailed Questionnaire Data in a Study of Swine Congenital Malformations *Can J Comp Med* 37:413-417.



Figura 1. Agnello cefalotoracopago. Visione d'insieme e radiogramma.



Figura 2. Agnello cefalotoracopago. Malformazioni nel cranio (palatoschisi e cranioschisi con encefalomeninogeoce) e visione del sistema nervoso centrale.



Figura 3. Agnello cefalotoracopago. Visione delle cavità toracica ed addominale, con visceri in situ e dopo la loro rimozione.

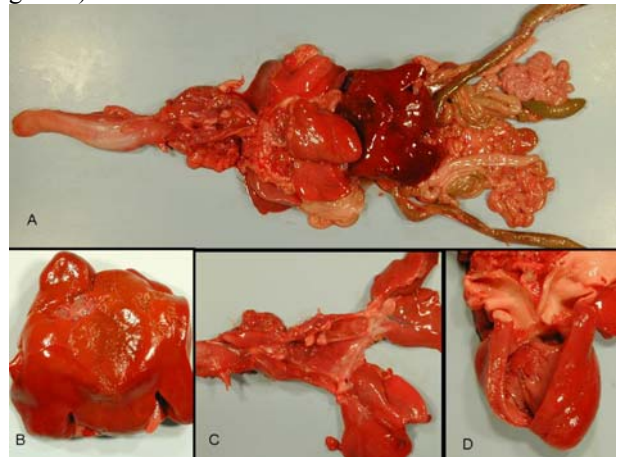


Figura 4. Agnello cefalotoracopago. A: visione d'insieme dei visceri splanchnici. B: fegato. C: polmoni. D: cuore.



Figura 5. A sinistra: preparato scheletrico di ovino cefalotoracopago deradelfo (*Octopus biauritus*) a sviluppo analogo al caso presentato (1853). A destra: preparato scheletrico di ovino cefalotoracopago janiceps (*Octopus janus*); notare nell'inserto la visione di profilo, che mostra lo sviluppo di due facce (1870).

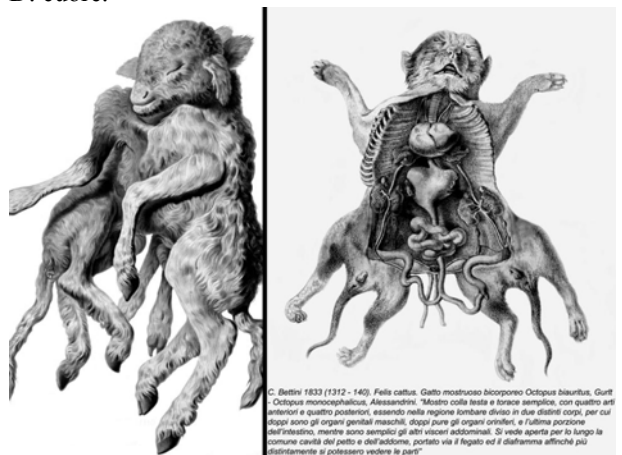


Figura 6. A sinistra: disegno dal vivo ad opera di Cesare Bettini (1853) di ovino cefalotoracopago deradelfo (*Octopus biauritus*) a sviluppo analogo al caso presentato. A destra: disegno dal vivo con descrizione originale a cura dell'Alessandrini di gatto cefalotoracopago deradelfo (*Octopus biauritus*) (1833).

A CASE OF CEPHALOTHORACOPAGUS TWINNING IN A LAMB

Cephalothoracopagus is a rare form of conjoined twinning with fused heads, necks and thoraxes but separate spines, limbs and pelvises and a variable degree of internal organs duplication. The presented case is that of a stillborn male lamb, which showed one head (with one face, cranioschisis and palatoschisis), one neck, two fused chests, 2 spines, 2 abdomens, 8 limbs and 2 tails (cephalothoracopagus deradelphus). Internal organs were one heart, 4 lungs, one abortive tracheo-esophageal tube, one liver, two complete gastrointestinal tracts, 2 spleens, 4 testis, 4 kidneys and 2 bladders. The case is compared with similar cephalothoracopagus monsters collected at our Veterinary Pathology and Teratology Museum since 1800.

Keywords: cephalothoracopagus, *Octopus*, conjoined twins, teratology, ovis

IPERPLASIA CISTICA DELLA CISTIFELLEA IN UN CANE

Vinci Annachiara, Brunetti Barbara, * Mazzi Antonella, Sarli Giuseppe

*Sezione di Patologia Generale e Anatomia Patologica. Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia animale (DSPVPA). *Sezione Medicina Interna. Dipartimento Clinico Veterinario. Università degli Studi di Bologna.*

Nel corso degli anni diversi autori hanno documentato l'esistenza di un'alterazione della cistifellea nel cane comunemente identificata con il nome di iperplasia cistica. Il caso che riportiamo in questo lavoro si riferisce ad un cane giunto nell'ottobre 2005 presso il servizio di Anatomia Patologica Veterinaria del DSPVPA di Bologna. L'animale, un meticcio femmina di 11 anni, proveniva dal Dipartimento Clinico Veterinario, sezione Medicina Interna di Bologna. I proprietari riferivano anoressia, costipazione e scialorrea; l'esame obiettivo generale riportava un marcato abbattimento del sensorio, ittero di cute, sottocute e mucose apparenti, temperatura di 35,3 °C. E' stata eseguita l'eutanasia. La necropsopia ha confermato la colorazione itterica di cute, sottocute, piani connettivali e sclere e la diagnosi è stata di ittero da colestasi extraepatica a causa di una impossibilità di dimostrare la pervietà del coledoco. La bile presente era molto densa mentre nessuna alterazione macroscopica era apprezzabile sulla superficie mucosa. L'esame istologico ha evidenziato alterazioni della cistifellea riferibili ad una iperplasia cistica dell'epitelio della mucosa con coinvolgimento anche dell'epitelio del dotto coledoco che presentava la stessa lesione fino allo sbocco nell'intestino a livello di papilla duodenale. A differenza della maggior parte dei casi descritti in letteratura in cui l'iperplasia cistica della cistifellea non determina la comparsa di una sintomatologia clinica evidente, il caso che riportiamo risulta peculiare poiché tale patologia è stata responsabile di una sindrome itterica post-epatica e, come tale, dovrebbe essere inclusa nelle diagnosi differenziali di ittero da colestasi nel cane.

Parole chiave: iperplasia, cisti, cistifellea, ittero, cane

INTRODUZIONE

L'iperplasia cistica della cistifellea è una patologia riscontrata nei cani prevalentemente di età avanzata, così come testimonia uno studio (King, 1990) condotto sull'iperplasia cistica e la formazione di polipi epiteliali della cistifellea. Sebbene l'eziologia non sia ancora dimostrata, secondo alcuni autori la somministrazione prolungata di progestinici sarebbe causa di insorgenza della malattia per effetto della stimolazione diretta sull'epitelio della cistifellea (Kovatch et al., 1965). Secondo altre fonti (King, 1990) invece la causa potrebbe essere la somministrazione nei soggetti anziani di estrogeni per l'incontinenza urinaria. Rubini et al. (2005) hanno descritto un caso di mucocele della cistifellea in un cane Schnauzer nano maschio di otto anni che aveva mostrato una sintomatologia aspecifica (letargia, dolore addominale, leucocitosi e ipercolesterolemia). Nella maggior parte dei casi si tratta però di una patologia che non determina la comparsa di una sintomatologia clinica evidente ma solo modificazioni

dell'aspetto macroscopico della cistifellea. In corso di iperplasia cistica, in molti dei casi descritti, non si rivelano anomalie apparenti sulla superficie sierosa ad eccezione del caso riportato da Jones et al. (1997) in cui i noduli multipli della mucosa contenevano una quantità così elevata di muco che l'organo ha raggiunto una dimensione fino a 5 volte maggiore rispetto a quella normale e nel caso segnalato da Taccini et al. (1983) in cui la cistifellea assumeva una conformazione a bisaccia con curvatura mediana quasi ad angolo retto, corpo con espansione trasversale a livello della curvatura con un diametro di oltre 4 cm, porzione distale terminante a cul di sacco. Le modificazioni più importanti comunque sono riportate a carico della mucosa: Cullen et al. (2001) hanno descritto un colore grigio-biancastro, un inspessimento generalizzato e una consistenza spugnosa apprezzabile in seguito al lavaggio della bile residua. Sono state rilevate anche masse sessili o polipoidi e alcune cisti, larghe, sporgenti all'interno del lume, numerose e di dimensioni da 1 a 3 mm, la maggior parte di esse

contenenti una grande quantità di muco (Cullen et al., 2001). Istologicamente le cisti appaiono tappezzate da un epitelio batiprismatico monostratificato e contengono muco PAS positivo (Marcato, 2002).

MATERIALI E METODI

Il caso che riportiamo si riferisce ad un cane meticcio femmina di 11 anni e 5 mesi, peso 5 kg, mantenuto in ambiente rurale, regolarmente vaccinato, riferito all'Ospedale Didattico Veterinario della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Bologna nell'ottobre del 2005. Secondo quanto riferito dai proprietari, l'animale da 4 giorni accusava anoressia, costipazione, scialorrea ed un ingravescente abbattimento del sensorio. In seguito alla visita clinica e, sulla base di una diagnosi generica di sindrome itterica, è stato intrapreso un protocollo diagnostico comprensivo di: esame del sangue (esame emocromocitometrico e biochimico clinico, emogasanalisi, profilo coagulativo) e sierodiagnosi per *Leptospira* spp.. A seguito del repentino decesso dell'animale non è stato possibile eseguire un'esame radiografico ed ecografico dell'addome. Successivamente presso il servizio di anatomia patologica è stata eseguita la necropsia ed in questa sede sono stati anche fissati in formalina campioni di fegato e di cistifellea oltre ad intestino, nel tratto della papilla duodenale, per l'esame istologico.

RISULTATI

L'esame obiettivo generale ha rilevato uno scadente stato di nutrizione, decubito laterale permanente con grave depressione del sensorio, evidente disidratazione, marcata colorazione itterica di cute, sottocute e mucose apparenti, grave ipotermia (35,3° C), polso debole e frequente. Il tempo di riempimento capillare era aumentato (> 2"), i linfonodi esplorabili erano nella norma, la palpazione dell'addome risultava impedita dalla tensione della parete. Le alterazioni dei parametri ematobiochimici consentivano di riferire la sindrome itterica ad ittero colostatico (Bilirubina totale 35,57 mg/dl di cui Bilirubina

indiretta 12,29 mg/dl, Bilirubina diretta 23,28 mg/dl, Acidi Biliari 654 µmol/L; SAP 7682 U/L, GGT 67,9 U/L) associato a danno epatocellulare (AST 164 U/L; ALT 395 U/L). La necropsia ha confermato una evidente colorazione itterica di cute, sottocute, piani connettivali e sclere. Inoltre la prova di pervietà del coledoco è risultata negativa e alla compressione forzata della cistifellea non è stato possibile apprezzare fuoriuscita di bile a livello della papilla duodenale. Quest'ultima è anche risultata procidente per edema ed iperemia sulla superficie mucosa intestinale. La mucosa del tratto prossimale del duodeno è apparsa iperemica ed edematosa. Il pancreas, nel tratto adeso alla parete intestinale si presenta duro e fibroso. Il fegato è apparso normale per forma, colore, volume e consistenza. Non sono state rilevate alterazioni a carico di altri organi ed apparati. L'esame istologico ha evidenziato alterazioni della mucosa della cistifellea riferibili a dilatazioni cistiche intramurali ed iperplasia dell'epitelio con formazione di papille (Fig. 1). L'epitelio che rivestiva le cavità cistiche e la superficie mucosa appariva batiprismatico, con limiti cellulari ben evidenti, nucleo basale ed ampio citoplasma chiaro. Il contenuto delle cisti ed il materiale adeso sulla superficie mucosa appariva amorfo e basofilo, esprimente sia PAS che alcian positività con la reazione Alcian-PAS a pH 2,5 (Fig. 2). L'iperplasia cistica interessava anche il coledoco sia nel suo decorso intramurale (Fig. 3) che a livello dello sbocco nell'intestino (Fig. 4). A livello epatico erano apprezzabili, negli spazi portobiliari, dotti con contenuto mucoso basofilo, istochimicamente simile a quello presente nella cistifellea (Fig. 5) ed una lieve reazione flogistica periduttale con scarso accumulo di linfociti (Fig. 6) mentre il parenchima epatico mostrava iperemia passiva e lieve accumulo intracellulare di pigmenti biliari.

DISCUSSIONE

Abbiamo ritenuto questo caso interessante da documentare poichè, dai dati raccolti in letteratura (vedi introduzione), l'iperplasia cistica della cistifellea risulta essere una patologia abbastanza rara nel cane e soprattutto poichè non è mai documentata associata ad una

sintomatologia clinica evidente. Nel nostro caso invece, i dati raccolti dall'esame clinico, in particolare la colorazione itterica molto evidente del soggetto, associata alle indicazioni fornite dai parametri ematobiochimici, hanno deposto per una sindrome itterica da ittero colostatico, confermata dall'indagine necroscopica e supportata dal riscontro istologico di iperplasia cistica interessante non soltanto la mucosa della cistifellea, ma anche, verosimilmente rappresentando il vero movente colostatico, la parete del coledoco fino al suo sbocco nella papilla duodenale.

CONCLUSIONI

A differenza della maggior parte dei casi descritti in letteratura in cui l'iperplasia cistica della cistifellea non determina la comparsa di una sintomatologia clinica evidente, il caso che riportiamo risulta peculiare poiché tale patologia è stata responsabile di una sindrome itterica post-epatica e, come tale, dovrebbe essere inclusa nelle diagnosi differenziali di ittero da stasi nel cane.

BIBLIOGRAFIA

1. Rubini G., Barilli M., Bettini G., Simion C. (2005): Mucocele della cistifellea in un cane. *Veterinaria* 19 (4). 39
2. Jones T.C., Hunt R.D., King N.W.: The digestive system. In Jones T.C., Hunt R.D., King N.W.: *Veterinary Pathology*, Williams & Wilkins, VI Edizione, 1997.
3. King M. (1990): Cystic hyperplasia and epithelial polyp formation of the gallbladder. *Veterinary Medicine*, 85, 680.
4. Kovatch RM., Ildebrand P.K., Marcus L.C. (1965): Cystic Mucinous Hypertrophy of the Mucosa of the Gall Bladder in the dog. *Path. Vet.*, 2, 574.
5. Marcato P.S. (2002): Fegato e Pancreas in: *Patologia Sistematica Veterinaria*. Ed. Edagricole, p. 740
6. Taccini E., Braca G., Renzoni G. (1983): Iperplasia cistica mucinica in colecisti di cane. *AttiSISVet* 37, 538.
7. Cullen J.M., MacLachlan N.J.: Liver, biliary system and exocrine pancreas. In: McGavin D., Carlton W.W., Zachary J.F. *Thomson's Special Veterinary Pathology*, Mosby, III Edizione, 2001.

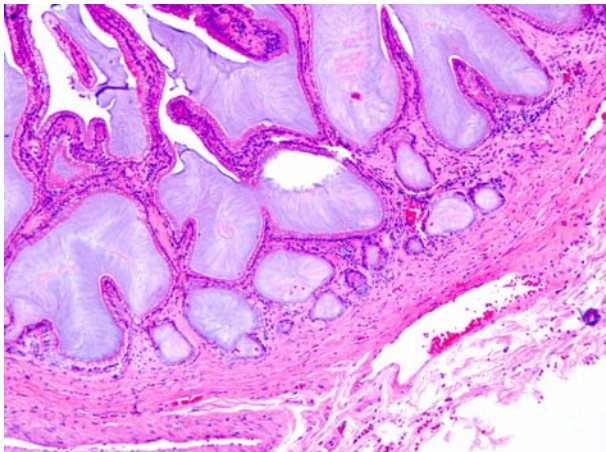


Figura 1. Cane. Cistifellea. Dilatazioni cistiche contenenti materiale mucoso basofilo e iperplasia dell'epitelio con formazione di papille. E-E. 10x.

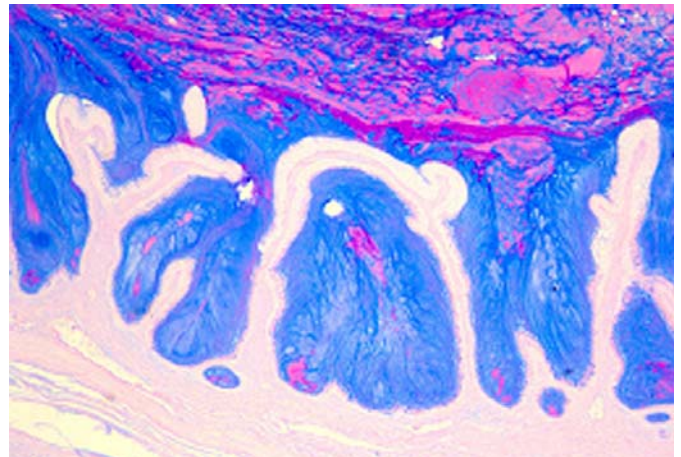


Figura 2. Cane. Cistifellea. Materiale mucoso sia alcian che PAS positivo all'interno delle cisti e sulla superficie mucosa. Alcian-PAS pH 2,5. 10x.



Figura 3. Cane. Dotto coledoco nel percorso intramurale nell'intestino. Iperplasia cistica della mucosa. E-E. 5x.

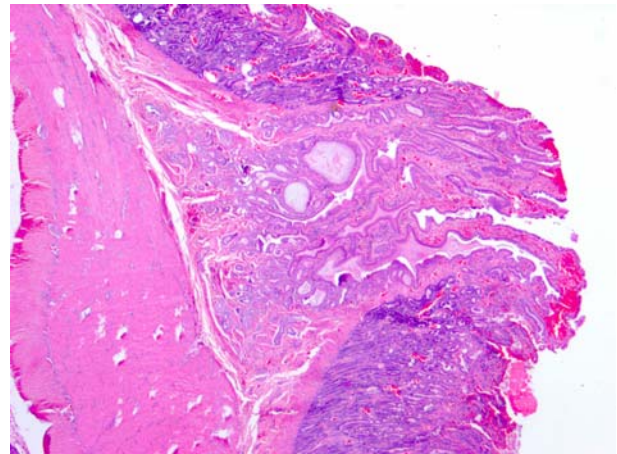


Figura 4. Cane. Dotto coledoco nello sbocco nell'intestino a livello della papilla duodenale. Iperplasia cistica della mucosa. E-E. 2,5x.

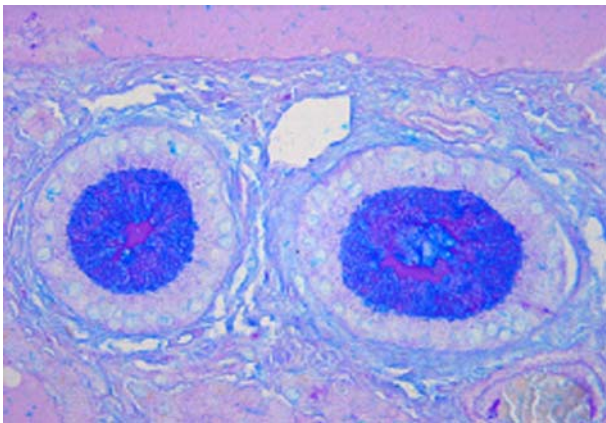


Figura 5. Cane. Fegato, spazio porto biliare. Contenuto alcian e PAS positivo all'interno dei dotti biliari. Alcian-PAS pH 2,5. 40x.

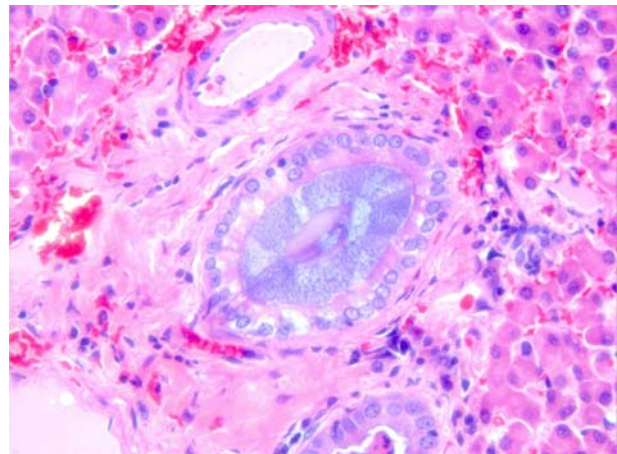


Figura 6. Cane. Fegato, spazio portobiliare. Lieve reazione flogistica periduttale. E-E. 40x.

CYSTIC HYPERPLASIA OF THE GALL BLADDER IN A DOG

A 11-year old female dog was admitted to Veterinary Clinical Department of the Bologna University, with clinical history of anorexia, constipation and ptyalism. Clinical findings included rectal temperature of 35.3°C, depression and jaundice. The dog was euthanased and submitted for necropsy at the Department of Veterinary Public Health and Animal Pathology. Gross changes were jaundice evident in skin, subcutis and sclerae and a non-patency of choledoch duct. The final diagnosis was jaundice by extra-hepatic cholestasis. Microscopical examination showed intramural cysts originating from hyperplasia of the gall bladder epithelium. The same lesion was present in the extrahepatic bile ducts until the duodenum. Unlike cases described in the literature where cystic hyperplasia of the gall bladder had no clinical evidence, the case here reported is peculiar because it is responsible for a post-hepatic jaundice and should be included in the differential diagnosis of cholestasis in the dog.

Keywords: hyperplasia, cyst, gall bladder, jaundice, dog

CORRELAZIONE TRA IL TEST TRAP-ELISA E L'IMMUNOISTOCHEMICA PER TERT NELLA DETERMINAZIONE DELLA TELOMERASI NEI TESSUTI MAMMARI DI GATTA

Panarese Serena, Fusaro Laura, Brunetti Barbara, Benazzi Cinzia, Sarli Giuseppe

Sezione di Patologia Generale e Anatomia Patologica - Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale - Facoltà di Medicina Veterinaria - Università di Bologna

L'enzima telomerasi è stato ampiamente studiato negli ultimi anni vista la sua presenza nei tessuti tumorali, ragione per la quale viene considerato un promettente marcatore prognostico.

Per la ricerca in esame sono stati impiegati 16 campioni di tessuto mammario di gatta (1 mammella normale, 1 lesioni displasiche, 1 caso di neoplasia benigna e 13 neoplasie maligne) ed un testicolo come controllo positivo, trattati con metodica immunohistochimica (IHC) con l'anticorpo anti-TERT e con la metodica TRAP-ELISA, con la finalità di valorizzare l'IHC come *test* alternativo al TRAP oggi ancora considerato il *gold standard* per lo studio dell'enzima.

L'espressione immunohistochimica di TERT è risultata di 3 tipi: nucleolare (più frequente), nucleare diffusa, citoplasmatica (più rara). La positività è stata quantificata con analisi di immagine, separatamente per l'espressione solo nucleolare, solo nucleare, solo citoplasmatica, nucleare e nucleolare contemporaneamente ed, in tutti i casi, espressa come numero medio di cellule positive o come numero corretto per la cellularità (valore percentuale). Dai dati emerge complessivamente che la variabile con maggiore potere discriminante sia nei valori medie che percentuali tra lesioni benigne vs maligne o positivi vs negativi al test TRAP-ELISA è quella che contempla la positività immunohistochimica contemporaneamente nel nucleo e nel nucleolo. La correlazione di Pearson tra il risultato TRAP positivo o negativo e tutte le variabili prese in considerazione ha messo in evidenza una correlazione significativa e direttamente proporzionale solo con la variabile espressione contemporanea nel nucleo e nel nucleolo con un coefficiente di correlazione pari a 0,53 per i dati espressi come media e 0,57 per i dati espressi come percentuale.

L'indagine eseguita ha permesso in primo luogo di stabilire la cross-reazione dell'anticorpo impiegato con tessuti del gatto, dato non presente in letteratura. L'impiego della metodica immunohistochimica per l'individuazione della subunità catalitica TERT della telomerasi permette di apprezzare diversi pattern di espressione ma solo uno, quello con espressione contemporanea nucleare e nucleolare, risulta correlato al risultato della metodica impiegata per la stima dell'attività telomerasica, cioè la TRAP. La correlazione tra le due metodiche è significativa ma con coefficienti di correlazione non elevati, verosimilmente in considerazione del fatto che le due metodiche sono tra loro più complementari che alternative.

Parole chiave: gatto, ghiandola mammaria, IHC, telomerasi, TRAP-ELISA, tumore

INTRODUZIONE

La telomerasi è stata molto studiata negli ultimi anni vista la sua presenza nei tessuti tumorali, motivo per cui viene considerata un importante marcatore prognostico. E' un enzima fondamentale nella replicazione del DNA, agisce in maniera particolare nel meccanismo di allungamento dei telomeri, le parti terminali dei cromosomi lineari, che altrimenti progressivamente si accorcerebbero provocando la morte cellulare. La telomerasi può così contribuire allo sviluppo neoplastico, dal momento che i telomeri in questo modo continuano ad allungarsi rendendo la cellula immortale (Burger et al., 1997; Holt et al., 1997; Chatziantonou, 2001; Shay et al., 2001;

Boldrini et al., 2002; Cong et al., 2002; Argyle et Nasir, 2003).

L'enzima è presente sia nelle cellule normali che in quelle tumorali, localizzata nel nucleo, nei nucleoli e a livello citoplasmatico, in quantità più o meno notevole (Kawakami et al., 2000; Poremba et al., 2000; Hiyama et al., 2001; Wei et Younes, 2001; Martin et al., 2002; Panizo et al., 2002, Kyo et al., 2003; Yan et al., 2004; Brustmann, 2005, Luzar et al., 2005).

Ad oggi per la valutazione semi-quantitativa dell'enzima sono state utilizzate tecniche di biologia molecolare (TRAP ed RT-PCR) che misurano però l'attività enzimatica e non permettono la localizzazione nella cellula nonché la definizione del tipo cellulare che la

esprime (Matthews et Jones, 2001; Hiyama et Hiyama, 2003).

Con la colorazione immunoistochimica, invece, è possibile non solo localizzare la componente telomerasica a livello della singola cellula ma anche quantificarla (Poremba et al., 2000).

Scopo del lavoro è stato l'impiego della metodica immunoistochimica in una casistica di 16 casi di tessuto mammario di gatta con la finalità:

1. di valutare con metodica immunoistochimica l'espressione della subunità catalitica della telomerasi (TERT);
2. oggettivare mediante analisi di immagine l'entità della positività immunoistochimica;
3. confrontare i risultati dell'indagine immunoistochimica con i risultati della TRAP.

Dal momento che la subunità catalitica dell'enzima è il fattore limitante l'attività enzimatica stessa, lo scopo finale della sperimentazione è valutare se i risultati ottenuti con le due metodiche siano sovrapponibili, e quindi si possa valorizzare l'immunoistochimica, metodica più semplice e meno costosa della TRAP, per la valutazione di questo importante marcatore tumorale.

MATERIALI E METODI

Sono stati impiegati per l'indagine 16 campioni di tessuto mammario provenienti da mastectomie eseguite presso il Dipartimento clinico veterinario della facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Bologna e presso cliniche veterinarie private.

I tessuti sono giunti presso il laboratorio entro 6 ore dall'intervento. Sono stati campionati, mediante l'estrazione dalla massa, pezzetti di tessuto di circa 0,5 cm³, successivamente divisi in due metà di cui una fissata in formalina per l'esame istologico e l'indagine immunoistochimica (IHC) e l'altra congelata in azoto liquido e poi stoccata a -80°C in attesa di essere processata con la metodica TRAP.

I campioni fissati in formalina sono stati poi inclusi in paraffina. Dai pezzi inclusi sono state ottenute due sezioni seriate di 4 micron di spessore, impiegate rispettivamente per la

colorazione con ematossilina-eosina (E-E) per la diagnosi istologica e per l'indagine IHC.

La casistica comprendeva 1 mammella normale, 1 lesione displasica, 1 tumore benigno e 13 neoplasie maligne.

La diagnosi istologica è stata eseguita seguendo i criteri classificativi di Misdorp *et al.* (1999) e, limitatamente alle lesioni neoplastiche maligne, si è proceduto anche alla stadiazione secondo Gilbertson *et al.* (1983) adattata alla gatta da Mandelli *et al.* (1987) in:

1. stadio istologico 0, o tumore maligno non infiltrante, quando la proliferazione neoplastica non appariva superare la membrana basale;
2. stadio istologico I, o tumore maligno infiltrante con invasione stromale, cioè superamento della membrana basale ed invasione dello stroma;
3. stadio istologico II, o tumore maligno infiltrante con emboli nei vasi linfatici o ematici e/o metastasi al linfonodo regionale (inguinale superficiale o ascellare ipsilaterale).

Immunoistochimica

Le sezioni sono state deparaffinate, reidratate e sottoposte a trattamento di inibizione delle perossidasi endogene con una soluzione alcolica (metanolo) allo 0,3% di acqua ossigenata (H₂O₂) per 30 minuti a temperatura ambiente. Le sezioni sono state poi immerse in tampone citrato a pH 6.0 e trattate con forno a microonde a 750 W per due cicli di 5 minuti ciascuno e quindi lasciate raggiungere la temperatura ambiente per 20 minuti. In seguito sono state incubate per una notte a 4°C con l'anticorpo anti-telomerasi-subunità catalitica (clone 44F12) (Novocastra) ad una diluizione di 1:50 con PBS. Per la rivelazione della reazione IHC è stato impiegato un metodo streptoavidina-biotina-perossidasi utilizzando un kit commerciale (DAKO LSAB Kit peroxidase). Come cromogeno, infine, è stata utilizzata la diaminobenzidina alla concentrazione di 0,04% per 7 minuti e come colorazione di contrasto l'ematossilina di Papanicolau. Nella casistica è stato incluso anche un controllo sicuramente positivo rappresentato da una sezione di testicolo di gatto. Come controllo negativo veniva impiegato un anticorpo dello stesso isotipo ma di irrilevante specificità.

TRAP-ELISA

Per l'esecuzione di questa prova ci si è avvalsi di un kit commerciale "Telo TAGGG telomerase PCR ELISA^{PLUS}" fornito dalla Roche Diagnostics.

L'estrazione delle proteine è stata realizzata con il tampone di lisi, incubando in ghiaccio per 30 minuti e centrifugando successivamente a 16000 x g per 20 minuti a 4°C.

La amplificazione con PCR ha previsto una fase iniziale di allungamento a 25°C per 30 minuti; 5 minuti a 94°C per l'inattivazione della telomerasi, seguiti da 33 cicli di amplificazione (denaturazione: 94°C per 30 secondi; annealing: 50°C per 30 secondi; polimerizzazione: 90 secondi a 72°C) ed infine 10 minuti a 72°C.

La reazione ELISA è stata rivelata misurando l'Assorbanza dei campioni a $\lambda=450\text{nm}$ con una lunghezza d'onda di riferimento di $\lambda=690\text{nm}$ (bianco). I campioni per essere considerati positivi dovevano presentare una $\Delta A > 0.20$ ($\Delta A = A_{450\text{nm}} - A_{690\text{nm}}$).

Analisi d'immagine

La positività immunoistochimica è stata quantificata mediante un sistema di analisi d'immagine basato su conta cellulare. Per ogni caso sono stati scelti random 10 campi con l'obiettivo 40x, purchè rappresentativi della diagnosi del caso preso in esame. Su ogni campo è stata applicata una griglia (Figura 1) costituita da 7 linee orizzontali ognuna di 136,9 μm e distanti l'una dall'altra 18,21 μm . L'area della griglia era di 14949,48 μm^2 . Sono state contate, in ogni campo, le cellule intersecate dalle linee orizzontali, tenendo separati nei conteggi il tipo di positività immunoistochimica per TERT: solo nucleare, solo nucleolare, contemporaneamente nucleare e nucleolare nella stessa cellula, citoplasmatica. In 3 campi il conteggio è stato esteso a tutte le cellule intersecate (sia positive che negative) in modo da avere a disposizione l'indicazione della cellularità media dei campi. Per ogni caso sono stati considerati due tipi di risultato: media (media aritmetica dei conteggi della stessa variabile nei 10 campi) e percentuale (frazione percentuale del valore medio di ogni variabile rispetto alla cellularità media dei campi del caso in esame).

Le variabili impiegate nell'analisi statistica sono state:

- media e percentuale di cellule con nuclei positivi;
- media e percentuale di cellule con nucleoli positivi;
- media e percentuale di cellule con nuclei e nucleoli contemporaneamente positivi;
- media e percentuale di cellule con citoplasma positivo;

Tutte le variabili sono state testate con lo Shapiro W-Test per la normalità. Per le variabili risultate a distribuzione normale i confronti sono stati eseguiti con l'analisi della varianza, in caso contrario è stato utilizzato il test di Spearman. I test sono stati condotti confrontando le variabili sopra elencate tra lesioni benigne e maligne e tra casi positivi e negativi al test TRAP-ELISA. La correlazione tra il risultato positivo o negativo al test TRAP-ELISA e tutte le variabili prese in considerazione è stato condotto con il test di Pearson. Un valore di $P < 0,05$ è stato considerato significativo.

RISULTATI

L'espressione immunoistochimica di TERT è risultata di 3 tipi: nucleolare (più frequente) (Figura 2), nucleare diffusa (Figura 3), citoplasmatica (Figura 4). Nel testicolo la positività si è rivelata del tipo nucleolare e più raramente nucleare diffusa; nella mammella normale invece è risultata di tipo nucleare e nucleolare sia nell'epitelio alveolare secernente che nei dotti; nelle lesioni displasiche e tumorali benigne si presentava una positività nucleolare rara ma molto intensa e nucleare diffusa (più debole e frequente), interessando una quota minoritaria di cellule (fino al 25%). Nei tumori maligni vi era prevalenza dell'espressione nucleare e nucleolare ma una maggiore espressione citoplasmatica ed una rilevabile positività nucleare di fibroblasti stromali e di linfociti infiltranti. L'espressione era esaltata nella componente neoplastica infiltrante, soprattutto negli emboli endovasali. Con il test TRAP una soglia pari a 0.2 ΔA ha permesso di distinguere i 6 casi positivi (tutti tumori maligni) dai 10 casi negativi (1 mammella normale, 1 tumore benigno, 1 displasia e 7 tumori maligni).

Dai dati ottenuti in seguito all'elaborazione statistica emerge complessivamente che la variabile con maggiore potere discriminante sia nei valori medie che percentuali tra lesioni benigne vs maligne e positive vs negative al test TRAP è quella che contempla la positività immunoistochimica contemporaneamente nel nucleo e nel nucleolo. La correlazione di Pearson tra il risultato TRAP positivo o negativo e tutte le variabili prese in considerazione ha messo in evidenza una correlazione significativa ($P < 0,05$) e direttamente proporzionale solo con la variabile espressione contemporanea nel nucleo e nel nucleolo con un coefficiente di correlazione pari a 0,53 per i dati espressi come media (Grafico 1) e 0,57 per i dati espressi come percentuale (Grafico 2).

DISCUSSIONE

L'indagine eseguita ha permesso in primo luogo di stabilire la cross-reazione dell'anticorpo impiegato con tessuti del gatto, dato non presente in letteratura. L'espressione di positività immunoistochimica è risultata di tipo nucleolare, nucleare, nucleolare e nucleare nella stessa cellula e citoplasmatica.

Poiché in letteratura sono riportate diverse modalità di espressione immunoistochimica della positività per la proteina, ma non viene assolutamente menzionato, nel confronto con la metodica TRAP, quale di esse correli meglio, si è proceduto ad una stima su linee parallele della positività confrontando i pattern di positività immunoistochimica con i risultati TRAP-ELISA. L'elaborazione statistica delle variabili in termini di valori media e percentuale ha permesso di rilevare, confrontando tra gruppi benigni vs maligni e TRAP positivi vs TRAP negativi, che la variabile discriminante è risultata essere il numero di cellule con positività nucleare e nucleolare contemporanea nella stessa cellula.

I coefficienti di correlazione, però, non sono elevati. Ciò verosimilmente riflette i limiti di entrambe le metodiche. Infatti, mentre il saggio TRAP permette di determinare la presenza di attività enzimatica, senza però fornire indicazioni sulla localizzazione istologica della proteina, la colorazione IHC identifica la subunità catalitica dell'enzima ma non dà

informazioni in merito all'attività. Il risultato del TRAP non discrimina tra un tumore negativo nella componente carcinomatosa, ma avente cellule infiammatorie positive nello stroma, da un tumore positivo nella componente carcinomatosa. La metodica immunoistochimica, offrendo il vantaggio di una individuazione del contesto istologico, può permettere di determinare tale discriminazione, anche se il risultato ha il limite di riflettere solo la presenza della subunità catalitica e non la presenza di attività enzimatica.

CONCLUSIONI

L'impiego della metodica immunoistochimica per l'individuazione della subunità catalitica TERT della telomerasi permette di apprezzare diversi pattern di espressione ma solo uno, quello con espressione contemporanea nucleare e nucleolare, risulta correlato al risultato della metodica TRAP. La correlazione tra le due metodiche è significativa ma con coefficienti di correlazione non elevati, verosimilmente in considerazione del fatto che le due metodiche sono tra loro più complementari che alternative.

BIBLIOGRAFIA

1. Argyle D.J., Nasir L. (2003) Telomerase: A Potential Diagnostic and Therapeutic Tool in Canine Oncology. *Vet. Pathol.*, 40: 1-7.
2. Boldrini L., Flaviani P., Gisfredi S., Zucconi Y., Di Quirico D., Berti P., Spisni R., Galleri D., Materazzi G., Fasolo F., Miccoli P., Pingitore R., Fontanini G. (2002) Evaluation of telomerase in the development and progression of colon cancer. *Int. J. Mol. Med.*, 10: 589-592.
3. Brustmann H. (2005) Immunohistochemical detection of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) and c-kit serous ovarian carcinoma: a clinicopathology study. *Gynecol. Oncol.*, 98: 396-402.
4. Burger A.M., Bibby M.C., Double J.A. (1997) Telomerase activity in normal and malignant mammalian tissues: feasibility of telomerase as a target for cancer chemotherapy. *British J. Cancer*, 75: 516-522.
5. Chatziantonou V.D. (2001) Telomerase: Biological Function and Potential Role in Cancer Management. *Pathol. Oncol. Res.*, 7: 161-170.

6. Cong Y., Wright W.E., Shay J.W. (2002) Human telomerase and its regulation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66: 407-425.
7. Gilbertson S.R., Kurzman I.D., Zacrau R.E., Huvitz A.I., Black M.M. (1983) Canine mammary epithelial neoplasms: biological implications of morphologic characteristics assessed in 232 dogs. *Vet. Pathol.*, 20: 127-142.
8. Hiyama E., Hiyama K., Yokoyama T., Shay J.W. (2001) Immunohistochemical detection of telomerase (hTERT) protein in human cancer tissues and a subset of cells in normal tissues. *Neoplasia*, 3: 17-26.
9. Hiyama E., Hiyama K. (2003) Telomerase as tumor marker. *Cancer Letters*, 194: 221-233.
10. Holt S.E., Wright W.E., Shay J.W. (1997) Multiple pathways for the regulation of telomerase activity. *Eur. J. Cancer*, 33: 761-766.
11. Kawakami Y., Kitamoto M., Nakanishi T., Yasui W., Tahara E., Nakayama J., Ishikawa F., Tahara E., Ide T., Kaijima G. (2000) Immunohistochemical detection of human telomerase reverse transcriptase in human liver tissues. *Oncogene*, 19: 3888-3893.
12. Kyo S., Masutomi K., Maida Y., Kanaya T., Yatabe and Nakamura, et al., (2003) Significance of immunological detection of human telomerase reverse transcriptase. *Am. J. Pathol.*, 163: 859-867.
13. Luzar B., Polijak M., Gale N., (2005) Telomerase catalytic subunit in laryngeal carcinogenesis- an immunohistochemical study. *Mod. Pathol.*, 18: 406-411.
14. Mandelli G., Scanziani E., Cairolo F. (1987) "Grading" istologico delle neoplasie mammarie dei carnivori. *La Clinica Veterinaria*, 110: 347-357.
15. Martin J.A., Kurriger G., Forrest E., de Young B., Buckwalter J.A. (2002) Immunohistochemical detection of telomerase in human chondrosarcomas. Work in progress 2002, <http://poppy.obrl.uiowa.edu/Biochem-lab.htm>.
16. Matthews P., Jones C.J. (2001) Clinical implications of telomerase detection. *Histopathology*, 38: 485-498.
17. Misdorp W., Else R.W., Hellmen E., Lipscomb T.P. (1999) *Histological Classification of Mammary Tumours of the Dog and Cat*, 2nd edn. Armed Forces Institute of Pathology, Washington
18. Panizo A., Echegoyen A., Merino M. J. (2002) Immunohistochemical detection of telomerase expression in tumoral and non tumoral breast tissues. Laboratory of Pathology. Nat. Cancer Inst. National Institutes of Health. Bethesda Maryland, U.S. Tratto dal IV Congresso Virtuale Ispanoamericano di anatomia patologica.
19. Poremba C., Scheel C., Hero B., Christiansen H., Schaefer K.L., Nakayama J., Berthold F., Juergens H., Boecker W., Dockhorn-Dworniczak B. (2000) Telomerase activity and telomerase subunits gene expression patterns in neuroblastoma: a molecular and immunohistochemical study establishing prognostic tools for fresh frozen and paraffin-embedded tissues. *J. Clin. Oncol.*, 18: 2582-2592.
20. Shay J.W., Zou Y., Hiyama E., Wright W.E. (2001) Telomerase and cancer. *Hum. Mol. Genet.*, 10: 667-685.
21. Wei R., Younes M. (2001) Immunohistochemical Detection of Telomerase Reverse Transcriptase in Colorectal Adenocarcinoma and Benign Colonic Mucosa. *Hum. Pathol.*, 33: 693-696.
22. Yan P., Benhattar J., Seeletang W., Stehle J-C., Bosman F.T. (2004) Immunohistochemical localization of htert protein in human tissues. *Histochem. Cell. Biol.*, 121: 391-397

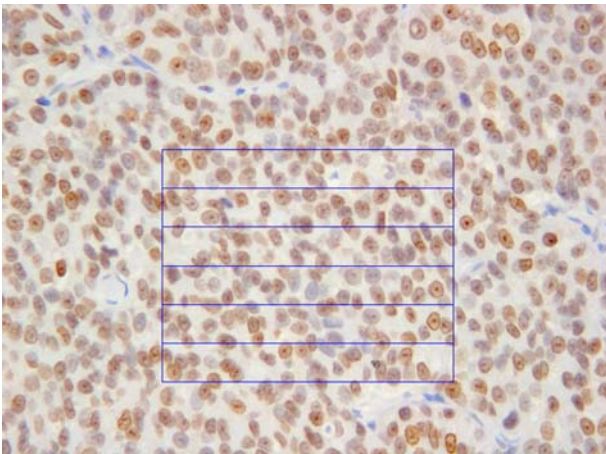


Figura 1. Gatto, mammella, carcinoma solido con positività nucleare e nucleolare per la telomerasi, 63x. L'immagine mostra la griglia usata per la quantificazione della reazione immunohistochimica.

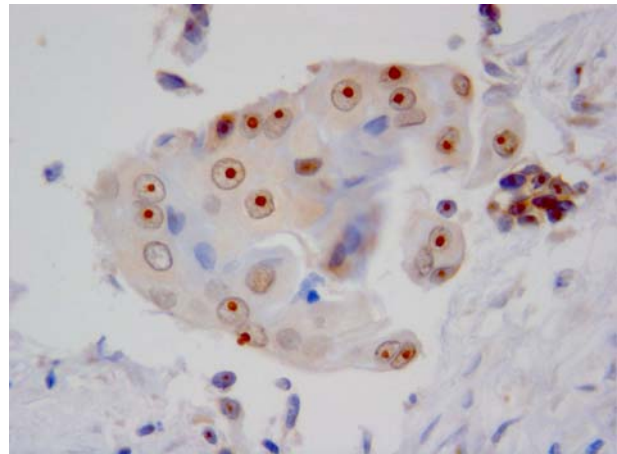


Figura 2. Gatto, mammella, carcinoma squamoso con positività nucleolare per la telomerasi, 63x.

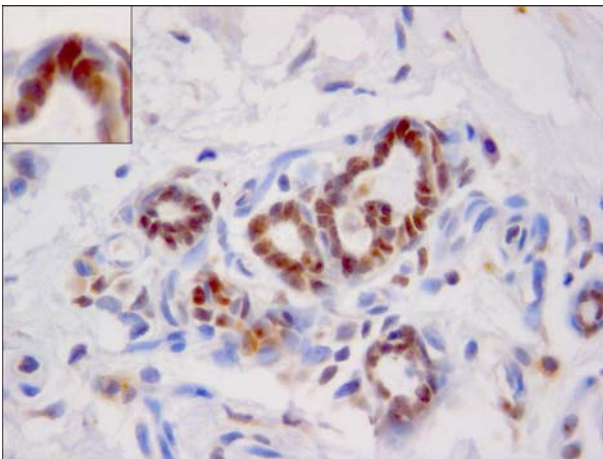


Figura 3. Gatto, mammella, dotti extralobulari con positività nucleare per la telomerasi, meglio evidenziata nel riquadro, 63x.

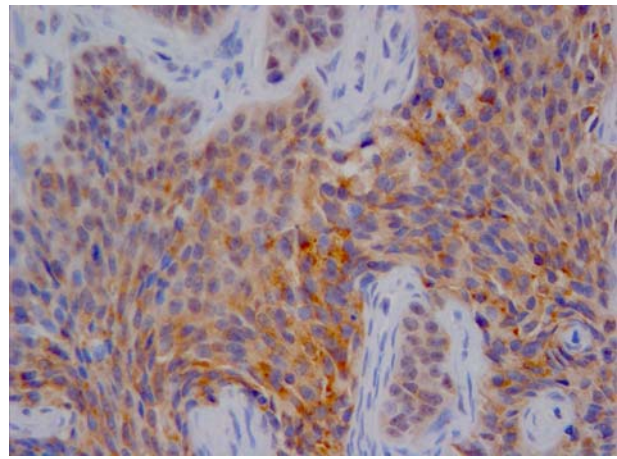


Figura 4. Gatto, mammella, carcinoma squamoso con positività citoplasmatica per la telomerasi nella componente carcinomatosa, 63x.

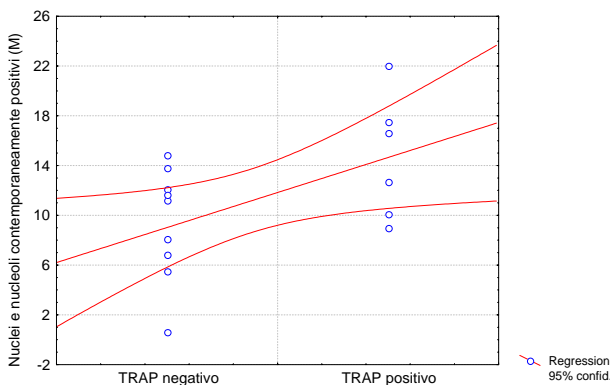


Grafico 1. Correlazione tra il risultato TRAP e la distribuzione del numero medio di cellule con nucleo e nucleolo contemporaneamente positivi. Pearson $P=0,034$; $R=0,53$.

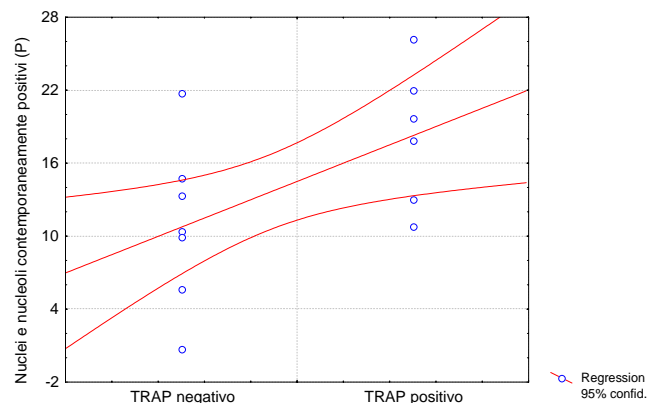


Grafico 2. Correlazione tra il risultato TRAP e la distribuzione percentuale di cellule con nucleo e nucleolo contemporaneamente positivi. Pearson $P=0,021$; $R=0,57$.

CORREATION BETWEEN TRAP-ELISA AND ANTI-TERT IMMUNOHISTOCHEMISTRY IN TELOMERASE ASSESSMENT OF FELINE MAMMARY SAMPLES

Sixteen feline mammary samples and a testis were tested with TRAP-ELISA and immunohistochemistry (IHC) to TERT to quantify telomerase expression. IHC positivity was found in the nucleolus or nucleus or, less frequently, in the cytoplasm. By image analysis, cells have been quantified as positive when singularly expressing nucleolar, nuclear and cytoplasmic stain or both nucleolar and nuclear expression in the same cell; the data have been summarized as mean value or percentage of positive cells. A significant difference was found in the pattern of IHC expression in the nucleus+nucleolus of the same cell, in the comparison between benign and malignant lesions and TRAP positive and TRAP negative cases. Pearson test showed a significant correlation of both mean values and percentages of nuclear+nucleolar expression and TRAP results ($R=0.53$ for mean values and $R=0.57$ for percentage). The use of anti-TERT IHC to assess *in situ* telomerase in tissues produced several patterns of expression, but only the contemporary expression in both nucleus and nucleolus correlated with TRAP. The coefficients of correlation were low probably because IHC and TRAP were complementary rather than alternative means of telomerase investigation.

Keywords: cat, mammary gland, IHC, telomerase, TRAP-ELISA, tumor

MICOSI INVASIVA INTRATORACICA IN UN GIOVANE CANE: ASPETTI CLINICI ED ANATOMOPATOLOGICI

Pascotto Ernesto*, Troi Angelo**, Pittioni Eugenio*, Galeotti Marco*

* Università di Udine, Sezione biologia e patologia animale, Dipartimento di Scienze Animali

** Libero professionista - Via Carducci 12, San Stino di Livenza (VE)

Un giovane cane (6 mesi) femmina di razza meticcica e di piccola taglia (6 kg) veniva portato alla visita clinica in seguito a problemi respiratori e difficoltà ad alimentarsi, persistenti da oltre tre mesi. L'esame clinico evidenziava: dispnea, tosse secca e modesta ipertermia ma uno stato generale complessivamente buono. L'esame radiografico mostrava un marcato disegno bronchiale ed un'area nettamente radio-opaca intratoracica posta cranialmente ai polmoni e comprimente la parte terminale della trachea e l'esofago. In diagnosi differenziale venivano considerate: massa neoplastica intratoracica, polmonite ab ingestis. Dopo circa 15 gg l'animale si presentava alla visita in condizioni gravemente peggiorate venendo a morte in quella sede. All'esame necroscopico si evidenziavano lesioni esclusivamente a carico dei polmoni. Una grossa formazione ad anello coinvolgeva la porzione caudale della trachea, le prime ramificazioni bronchiali e i lobi apicali dei polmoni. Essa appariva omogeneamente biancastra, piuttosto soda ed al taglio lardacea e lievemente cerebriforme. Vista l'incertezza diagnostica si eseguivano biopsie multiple per l'esame istopatologico. Istologicamente la massa appariva costituita perlopiù da una esuberante produzione connettivale in seno alla quale si rilevavano tragitti e focolai necrotico-purulenti, solo raramente granulomatosi, spesso accompagnati dalla presenza di ife fungine. Queste ultime apparivano settate, ramificate e con parete fortemente basofila e ben visibile in ematossilina-eosina. Si emetteva perciò diagnosi di micosi intratoracica invasiva extra e intrapolmonare ad organizzazione nodulare (micetoma). Alcune colorazioni istochimiche venivano condotte per la tipizzazione morfologica del micete.

La letteratura scientifica è particolarmente povera di segnalazioni di micosi nodulari a livello prevalentemente polmonare nel cane. Nel caso oggetto dello studio l'età del soggetto colpito, i reperti clinici e la tipologia delle lesioni, appaiono piuttosto particolari e rare, facendo emergere una notevole difficoltà diagnostica eziologica in sede ambulatoriale.

Parole chiave: cane, micosi, ife, massa intratoracica, anatomia patologica

SEGNALAMENTO E ANAMNESI

Un giovane cane (6 mesi) femmina di razza meticcica e di piccola taglia (6 kg) veniva portato in ambulatorio per una visita clinica. Il proprietario riferiva che da circa 3 mesi, con un aggravarsi della sintomatologia nell'ultimo mese, il cane mostrava difficoltà nell'ingestione del cibo pur in presenza di appetito ed importanti problemi respiratori (dispnea e tosse secca ad accessi).

ESAME CLINICO

All'esame clinico il paziente si presentava magro ma con mantello lucido e senza segni carenziali. La valutazione delle principali funzioni organiche confermava un'evidente difficoltà dell'animale ad assumere alimenti solidi. Oltre ad una moderata ipertermia (T:

39,8°C), si rilevavano gravi sintomi respiratori: dispnea, tosse secca ed una discreta polipnea che compariva solo sotto stimolazione del soggetto. Lo stato generale era comunque nel complesso buono. Alla luce delle informazioni anamnestiche e cliniche si procedeva alla somministrazione di un trattamento con antibiotico (amoxicillina e acido clavulanico 125mg bid per os) e di un integratore vitaminico. Dopo una settimana il proprietario riferiva un evidente miglioramento dello stato generale con una normalizzazione della temperatura corporea (38,5°C), riduzione della sintomatologia respiratoria, buon appetito e carattere allegro. La terapia venne così sospesa. Dopo alcuni giorni l'animale veniva nuovamente visitato per una rapida recidiva della sintomatologia ed in tale occasione veniva eseguita una radiografia della regione toracica ed addominale craniale (fig. 1). La proiezione latero-laterale della radiografia

toracica mostrava un'area nettamente radio-opaca intratoracica di notevole dimensione (diametro approssimativo: 7 cm), a margini irregolari e confusi, di aspetto non uniforme, posta cranialmente agli apici polmonari, dorsalmente e ventralmente alla trachea, comprimendo il tratto terminale della stessa con una riduzione quasi totale del lume radiotrasparente. Erano inoltre coinvolti dall'area radio-opaca i grossi rami vascolari alla loro origine cardiaca e rade piccole aree di radiopacità si rilevavano a livello dei lobi craniali dei polmoni.

Alla luce dei reperti anamnestici, clinici e radiografici venivano considerati in diagnosi differenziale: massa neoplastica intratoracica invasiva, polmonite ab ingestis complicata, processo infiammatorio produttivo, malformazione congenita. Si forniva immediata terapia di sostegno per procedere successivamente ad ulteriori approfondimenti diagnostici, ma l'animale veniva a morte durante una gravissima crisi respiratoria. Per chiarire l'eziopatogenesi della malattia veniva eseguita la necropsia del soggetto. All'esame necroscopico si evidenziavano lesioni esclusivamente a carico del mediastino e dei polmoni di difficile interpretazione diagnostica che stimolavano l'invio del materiale al servizio diagnostico istopatologico della sez. di Biologia e Patologia Animale dell'Università di Udine per analisi supplementari.

ESAME ANATOMOPATOLOGICO MACROSCOPICO

La valutazione degli organi toracici evidenziava una grossa formazione multilobata color rosaceo-biancastro eterogeneo, posta ad anello attorno alla porzione più caudale della trachea ed alle prime ramificazioni bronchiali e coinvolgente, con alcune propaggini, i lobi apicali del polmone ed i grossi vasi emergenti dal cuore (fig. 2). Al taglio la formazione appariva uniformemente biancastra, lardacea, a tratti fibrosa, lievemente arborizzata (fig. 3). Le strutture in essa inglobate apparivano compresse ma non invase dalla formazione. La resistenza al taglio appariva discreta. La diagnosi macroscopica rimaneva incerta, anche se indirizzata prevalentemente verso la formazione neoplastica invasiva. Si eseguivano

percipi campionamenti per il successivo esame istopatologico.

ESAME ANATOMOPATOLOGICO MICROSCOPICO

Istologicamente la massa appariva costituita perlopiù da una esuberante produzione di connettivo (in alcune aree riferibile a connettivo denso irregolare) in seno alla quale le sezioni intercettavano tragitti fistolosi tortuosi necrotici, piogranulomatosi o lievemente necrotico-purulenti (fig. 4). Nei tragitti o al centro di piccoli granulomi si osservavano numerose ife fungine. Queste ultime apparivano disposte casualmente o raramente a raggiera, irregolarmente settate (lunghezza setti: 7-17 μm), di discreto diametro (3-6 μm), lievemente tortuose, molto ramificate (angolo di ramificazione variabile da 30° a 90°). Sotto il profilo istochimico esse apparivano particolarmente evidenti in EE, mostrando una spessa parete basofila ed una densa granulazione fortemente basofila adesa esternamente alla parete stessa (fig. 6A). Tali ife apparivano ben identificabili anche alle istochimiche Grocott, PAS, Gram Twort (perlopiù gram +), Tricromica di Masson secondo Goldner (colore giallo-verdastro), Sirius Red (color rosso brillante) (fig. 6). La colorazione istochimica Fontana-Masson per la ricerca di melanina, caratteristica dei feoifomiceti, risultava negativa.

La componente cellulare dominante era quella istiocitaria-epiteliode, mentre erano rari i macrofagi e rarissime le cellule multinucleate. Discreta la quantità di granulociti prevalentemente neutrofili. Nell'ambito della massa si rilevavano inoltre un piccolo numero di aree multifocali emorragico-infartuali. Alle lesioni sopra descritte si associava un evidente infiltrato linfocitario a carattere prevalentemente perivasale, solo raramente perineurale. La presenza di alcuni trombi vasali ricchi di cellule infiammatorie suggeriva il possibile coinvolgimento del lume vascolare da parte del fungo (angio-invasione), ma il mancato ritrovamento delle stesse non permetteva di escludere un'eziologia puramente compressiva. Dall'analisi istologica degli apici dei lobi craniali polmonari si osservava una grave compromissione del

parenchima polmonare. Si rilevava un diffuso ed intenso infiltrato macrofagico che si concentrava in alcuni lumi bronchiolari ectasici (fig. 5), altri lumi apparivano ripieni di ammassi di granulociti (neutrofili ed eosinofili) e cellule di desquamazione, tra le quali talvolta erano presenti ife micotiche identiche a quelle già descritte. Un infiltrato linfoplasmacellulare a manicotto intenso ma sottile coinvolgeva la periferia dei bronchi. Lo stesso tipo di infiltrato si localizzava in sede sub-pleurica. Alla luce delle lesioni osservate si emetteva perciò diagnosi di micosi intratoracica invasiva prevalentemente extrapolmonare ad organizzazione nodulare.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Anche se le segnalazioni in letteratura sono piuttosto scarse, le micosi da “muffe” (funghi opportunisti) degli organi interni nel cane sono ritenute da molti autori comuni ed a distribuzione mondiale (Roudebush, 1985). Le micosi sistemiche (diffusione ematogena) sembrano essere le forme clinico-anatomopatologiche riscontrabili con maggior frequenza. Sono piuttosto rare le segnalazioni di micosi da muffe a localizzazione primariamente polmonare (Garcia et al., 2001) e sembrano in generale poco frequenti le forme con sintomatologia respiratoria importante (Clercx et al., 1996) ad esclusione delle riniti micotiche. Il caso descritto si dimostra interessante sotto il profilo clinico per la sintomatologia e l'aspetto radiologico che

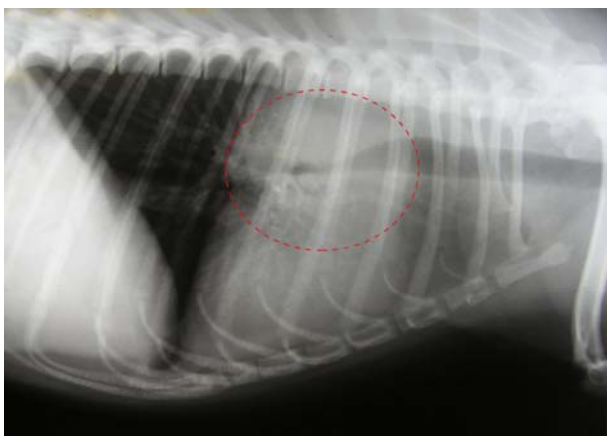


Figura 1. Proiezione radiografica latero-laterale del torace. Il cerchio tratteggiato indica un'area radio-opaca patologica intratoracica di notevole dimensione.

possono indurre diagnosi differenziali errate facendo prevalere l'ipotesi di lesione neoplastica invasiva. Tale ipotesi non sembra potersi escludere neppure all'esame anatomopatologico macroscopico, dove la lesione presenta una particolare organizzazione nodulare che non sembra descritta da altri autori. Ulteriori approfondimenti di biologia molecolare ed immunoistochimici potrebbero in futuro fornire indicazioni sull'inquadramento tassonomico della specie fungina coinvolta.

RINGRAZIAMENTI. Un particolare ringraziamento al dott. Di Benedetto Fabio per la collaborazione nelle colorazioni istochimiche.

BIBLIOGRAFIA

1. Clercx C., McEntee K., Snaps F., Jacquinet E., Coignoul F. 1996. Bronchopulmonary and disseminated granulomatous disease associated with *Aspergillus fumigatus* and *Candida* species infection in a golden retriever. *Journal of the American Animal Hospital Association* 32(2):139-145.
2. Garcia M.E., Caro A., Fragio C., Blanco I., Blanco J.L. 2001. A clinical case of canine mycotic pneumonia. *Journal of Veterinary Medicine, Series A* 48(8):501-506.
3. Roudebush P. 1985. Mycotic pneumonias. *Veterinary Clinics North American Small Animal Practice* 15:949-969.
4. Southard C. 1987. Bronchopulmonary aspergillosis in a dog. *J. American Veterinary Medical Association* 190(7):875-877.



Figura 2. Veduta dorsale dei polmoni. Si osserva la massa multilobata ad anello attorno alla trachea. A: massa; B: trachea; C: cuore



Figura 3. Sezione trasversale della formazione. Si nota l'aspetto lievemente arborizzato "a cavolfiore". La freccia indica il lume della trachea.

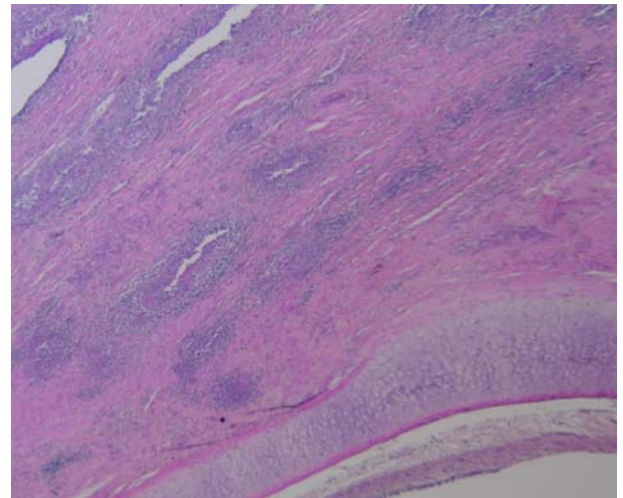


Figura 4. Sezione istologica ad ingrandimento panoramico della lesione in prossimità di un anello tracheale. EE.

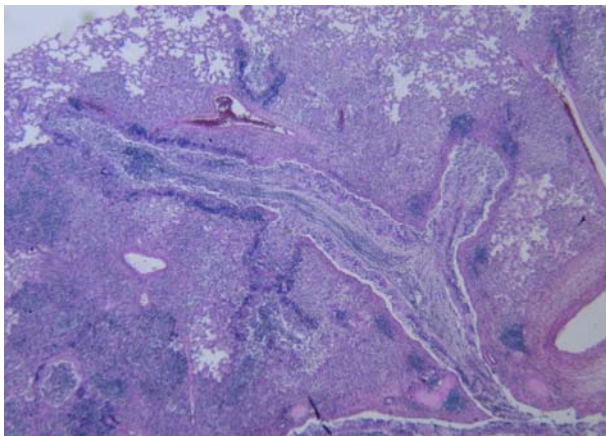


Figura 5. Sezione istologica del lobo craniale del polmone. EE.

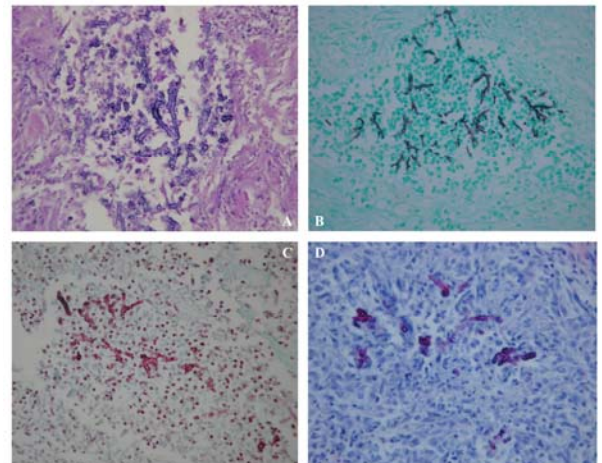


Figura 6. Riposta delle ife alle diverse colorazioni istochimiche. A: Ematossilina-Eosina; B: Grocott; C: Gram; D: Sirius red.

INVASIVE INTRATHORACIC MYCOSIS IN A YOUNG DOG: CLINICAL AND ANATOMOPATHOLOGICAL ASPECTS

A 6-month-old female, crossbreed, small size dog was examined because respiratory problems and difficulties in alimentation for more than 3 months. Examination revealed: dyspnea, nonproductive coughing and moderate fever but good general conditions. Thoracic radiography revealed a pattern of bronchial density and a well visible radio-opaque area, cranial to lungs, compressing the terminal portion of trachea and esophagus. Neoplastic mass and aspiration pneumonia were evaluated as possible diagnosis. After two week the general condition of the dog was getting seriously worse until the death during examination. At necropsy lesions were seen only in the lungs. A big, ring-shaped mass involved the caudal portion of trachea, first bronchial ramifications and apical lobes of lungs. Macroscopically it was white and firm, lardaceous and slightly cerebral-like at the cutting. Due to the diagnostic doubts, some samples were collected for the histopathological examination. Microscopically the mass was mainly composed of esuberant connectival proliferation, in which purulent/necrotic areas were found. These were only seldom granulomatoseous, but often matched with the presence of fungal hyphae. The hyphae were septate, ramificated and with a strong basophil wall (hematoxylin-eosin stain). Diagnosis was given of invasive, intrathoracic, extra and intrapulmonary, nodular mycosis

(mycetoma). Other histochemical stains were performed to better define the morphology of the pathogen involved.

Studies on nodular pulmonary mycosis in dogs are lacking. In this study the age of the patient, the clinical aspects and the lesions are particular and uncommon, for these reasons the clinical diagnosis was very difficult to give.

Keywords: dog, mycosis, hyphae, intrathoracic mass, pathology

PATTERNS DI GLICOSILAZIONE DELLA α_1 -GLICOPROTEINA ACIDA IN GATTI CLINICAMENTE SANI POSITIVI A CORONAVIRUS FELINO

Ceciliani Fabrizio, Prina Alessandra, Pocacqua Vanessa, Miranda Ribera Alba, Paltrinieri Saverio

Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria (DiPaV), Sezione di Patologia Generale e Parassitologia – Via Celoria 10, 20133 Milano

Nell'uomo alcuni pattern di glicosilazione della α_1 -glicoproteina acida (AGP) sono associati a resistenza a malattie infettive. La AGP aumenta persistentemente ed appare iposialilata in gatti con peritonite infettiva felina (FIP), mentre in gatti positivi per coronavirus felini (FCoV) ma clinicamente sani mostra ampie fluttuazioni quantitative, in parte correlate alla carica virale. Non è noto se in tali soggetti siano presenti anche variazioni della glicosilazione. In questo studio sono stati esaminati 10 gatti FCoV positivi asintomatici, sottoposti mensilmente a prelievo di sangue per 7 mesi, e 3 gatti SPF, campionati 2 volte come controllo negativo. L'AGP è stata purificata fatta migrare in SDS-PAGE, colorata con lectine specifiche per l'acido sialico. L'intensità delle bande positive, proporzionale alla quantità di acido sialico, è stata determinata densitometricamente. Mentre i gatti SPF hanno mostrato minime variazioni di glicosilazione, quelli FCoV positivi hanno mostrato ampie variazioni sia individuali che tra i diversi prelievi. In particolare, è stata rilevata ipersialilazione in posizione $\alpha(2-6)$ al prelievo 2 (non associata a variazioni della carica virale), ed in posizione $\alpha(2-3)$ ai prelievi 6 e 7, eseguiti in prossimità di episodi di FIP nell'allevamento e di aumenti dei titoli anticorpali nei gatti campionati. In conclusione, questo studio ha evidenziato transitorie ipersialilazioni, in un caso associate a variazioni della carica virale individuale o ambientale, il cui significato nella resistenza o suscettibilità alla FIP merita di essere approfondito.

Parole chiave: gatto, coronavirus felino, α_1 -glicoproteina acida (AGP), glicosilazione

INTRODUZIONE

L' α_1 -glicoproteina acida (AGP) è una proteina fortemente glicosilata,¹ ed il suo pattern di glicosilazione sembra essere associato, nell'uomo, a resistenza o a suscettibilità a malattie infettive.² L'AGP è una proteina di fase acuta "maggiore" nel gatto, ed aumenta in particolar modo in corso di FIP, patologia sostenuta da coronavirus felino (FCoV), nella quale raggiunge valori ematici superiori a quelli rilevabili in altre malattie, tanto da assumere un significato diagnostico.^{3,4} In un precedente lavoro⁴ abbiamo evidenziato come si possano registrare aumenti nella concentrazione ematica dell'AGP anche in gatti infetti con FCoV ma asintomatici, e come tali aumenti si verificano in corrispondenza di casi di FIP nel gruppo nel quale vivono gli animali sani esaminati. Tale aumento è stato riscontrato anche in un lavoro più recente,⁵ nel quale è stato notato che le fluttuazioni dell'AGP sono associate a variazioni dei titoli anticorpali e precedono fasi di riduzione della carica virale. Questo potrebbe indicare che

anche nel gatto l'AGP svolga un ruolo protettivo nei confronti di malattie virali, forse in relazione a variazioni nella sua glicosilazione. Il grado di sialilazione è infatti risultato ridotto solo in gatti sintomatici^{6,7} ma non nei FCoV-positivi non sintomatici.⁶ In questo studio abbiamo voluto verificare se il grado di sialilazione della AGP in gatti infetti ma non sintomatici sia variabile nel tempo come lo è la concentrazione ematica di AGP.

MATERIALE E METODI

Sono stati utilizzati gli stessi campioni di siero utilizzati nel lavoro citato in introduzione:⁵ tali campioni provenivano da 10 gatti FCoV positivi clinicamente sani viventi in un allevamento FCoV endemico nel quale si sono registrati casi di FIP anche durante il periodo di studio. I 10 gatti sono stati campionati ogni 30 giorni ed il siero è stato separato e congelato. Sono inoltre stati valutati 3 gatti SPF, campionati 3 volte anch'essi a distanza di circa un mese.

La purificazione della AGP è stata eseguita mediante due passaggi cromatografici: una cromatografia a scambio anionico seguita da una cromatografia a scambio cationico sull'eluito corrispondente alla frazione contenente AGP. Dopo ogni passaggio cromatografico la purezza dell'AGP è stata valutata mediante SDS-PAGE seguita da colorazione con Blu Coomassie, che in caso di presenza di AGP permetteva di evidenziare una banda positiva del peso molecolare di circa 49 kDa, seguita da Western Blotting e da immunocolorazione con un anticorpo specifico per la AGP felina gentilmente fornitoci dal Prof. David Eckersall dell'Università di Glasgow. Queste procedure hanno permesso di purificare AGP solo da due dei tre prelievi dei gatti SPF ed occasionalmente anche tra i gatti FCoV positivi la quantità di siero utilizzabile per la purificazione era troppo esigua per purificare la proteina.

Le AGP purificate sono state poi utilizzate in un ulteriore Western Blotting che è stato però colorato con lectine quali la MAA e la SNAI (Vector laboratories), in grado di legarsi specificamente all'acido sialico in posizione $\alpha(2-3)$ ed $\alpha(2-6)$. L'intensità delle bande corrispondenti alle singole AGP purificate è stata poi valutata densitometricamente ed espressa in densità ottica (D.O.) sotto forma di pixel rilevati.

Per ognuna delle due lectine, i risultati relativi ai diversi prelievi sono stati poi normalizzati in funzione di un pool di sieri SPF, in modo da annullare la variabilità legata ad ogni singola sessione di tests, e sono stati confrontati tra loro mediante Test di Friedmann.

RISULTATI

1) Gatti SPF: Il grado di sialilazione dell'AGP dei gatti SPF è risultato simile nei diversi prelievi, anche se la lectina SNAI (Fig. 1) ha evidenziato valori inferiori nel prelievo 2 rispetto al prelievo 1, ma senza differenze significative (Fig. 2). Per tale motivo, i sieri dei gatti SPF sono stati uniti in un pool la cui D.O. è servita da riferimento per tutte le singole letture, incluse quelle degli stessi SPF.

2) Gatti FCoV-positivi:

a) Lectina MAA (sialilazione in posizione $\alpha(2-3)$): le bande ottenute dopo colorazione con lectine nei diversi gatti esaminati sono riportate in figura 3. Rapportato in percentuale al valore di D.O. del pool di gatti SPF, il grado medio di sialilazione rilevato nei diversi prelievi con lectina MAA ha mostrato una modica diminuzione, peraltro non statisticamente significativa, dai prelievi 1 al 5 ed un successivo aumento, statisticamente significativo ($P<0,05$) sia nel prelievo 6 che nel prelievo 7 (Fig. 4);

b) Lectina SNAI (sialilazione in posizione $\alpha(2-6)$): le bande ottenute dopo colorazione con lectine nei diversi gatti esaminati sono riportate in figura 5. Rapportato in percentuale al valore di D.O. del pool di gatti SPF, il grado medio di sialilazione rilevato nei diversi prelievi con lectina SNAI ha mostrato un aumento statisticamente significativo ($P<0,05$) al prelievo 2, seguito da fluttuazioni non accompagnate da significatività statistica (Fig. 6).

DISCUSSIONE

Il grado di sialilazione della AGP dei gatti SPF è risultato decisamente omogeneo sia tra i diversi gatti che tra i due successivi prelievi nello stesso animale. Al contrario, il grado di sialilazione nei gatti FCoV positivi ha mostrato una notevole variabilità individuale. In alcuni casi la colorazione con lectine ha addirittura fornito esito negativo: sebbene non sia possibile escludere che tali soggetti presentassero una completa desialilazione dell'AGP, appare molto più verosimile che tali negatività siano imputabili a problemi metodologici, per cui i sieri di questi soggetti sono stati poi esclusi dall'analisi statistica. La variabilità rilevata negli altri soggetti FCoV positivi è molto verosimilmente responsabile della mancanza di significatività statistica tra alcuni dei prelievi successivi. Sia per quanto riguarda la colorazione con MAA che per quanto riguarda quella con SNAI, infatti, i valori medi rilevati nei prelievi sequenziali sono risultati spesso differenti ma solo raramente tali differenze sono risultate

significative. In particolare, risulta interessante il significativo aumento di sialilazione in posizione $\alpha(2-3)$ (lectina MAA) dopo il prelievo 5, quando in altri animali del gruppo si erano verificati casi di FIP, poiché gli stessi soggetti inclusi nel presente lavoro, avevano anche mostrato, proprio al prelievo 5, un aumento della concentrazione di AGP e degli anticorpi, seguito da una diminuzione della quantità di virus eliminato con le feci.⁵ Tale riscontro, paragonato al fatto che, al contrario, gatti con FIP conclamata mostrano anch'essi un progressivo aumento della concentrazione di AGP, ma associato ad iposialilazione della AGP stessa,⁶ può quindi essere interpretato come un'ulteriore supporto all'ipotesi che l'incremento della sialilazione dell'AGP possa essere associato a resistenza allo sviluppo della malattia (nel nostro caso associato a diminuzione della contaminazione intestinale), mentre una sua diminuzione possa favorire lo sviluppo della patologia. Non sembra invece avere nessuna correlazione con la carica virale o con le fluttuazioni nel titolo anticorpale e nella concentrazione di AGP l'aumento di sialilazione in posizione $\alpha(2-6)$ (lectina SNAI) dopo il prelievo 2.

CONCLUSIONE

L'analisi del pattern di glicosilazione dell'AGP purificata da gatti infetti da FCoV ma asintomatici ha evidenziato transitorie ipersialilazioni, in un caso (lectina MAA, che rappresenta la sialilazione in posizione $\alpha(2-3)$) associate a variazioni della carica virale individuale o ambientale, rilevate, sugli stessi campioni, in un lavoro precedente.⁵ Il significato di tale ipersialilazione nella resistenza o suscettibilità alla FIP merita quindi di essere approfondito.

BIBLIOGRAFIA

1. Nakano et al. (2004) *Glycobiology*, 14:431-41
2. Rabeih L et al. (1995) *Glycocon J* 12:7-16
3. Duthie S et al (1997) *Vet Rec* 141:299-303
4. Giordano A et al (2004) *Vet J* 167:38
5. Paltrinieri et al (in press) *Vet Immunol Immunopathol*
6. Ceciliani F et al (2004) *Vet Immunol Immunopathol*, 99:229-236
7. Cunningham K et al (2004) *Proc. 6th ESVCP/ECVCP meeting*, 238

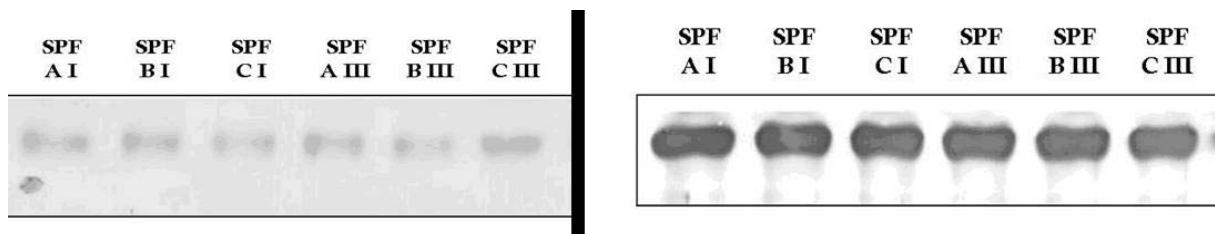


Figura 1. Western Blotting e colorazione con lectine delle AGP purificate da gatti SPF. A sinistra colorazione con lectina MAA, a destra colorazione con lectina SNAI.

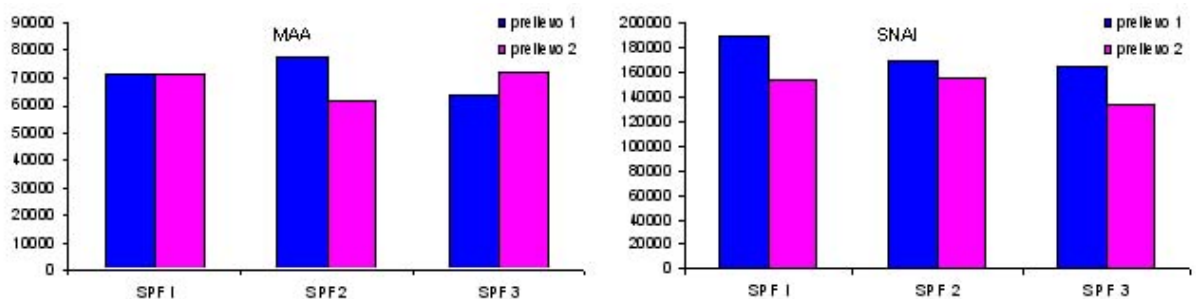


Figura 2. risultati dell'analisi densitometrica dei Western Blotting riportati in figura 1: Per entrambe le lectine esaminate si sono riscontrati, nei diversi prelievi, valori di D.O. sovrapponibili tra loro e non significativamente differenti.

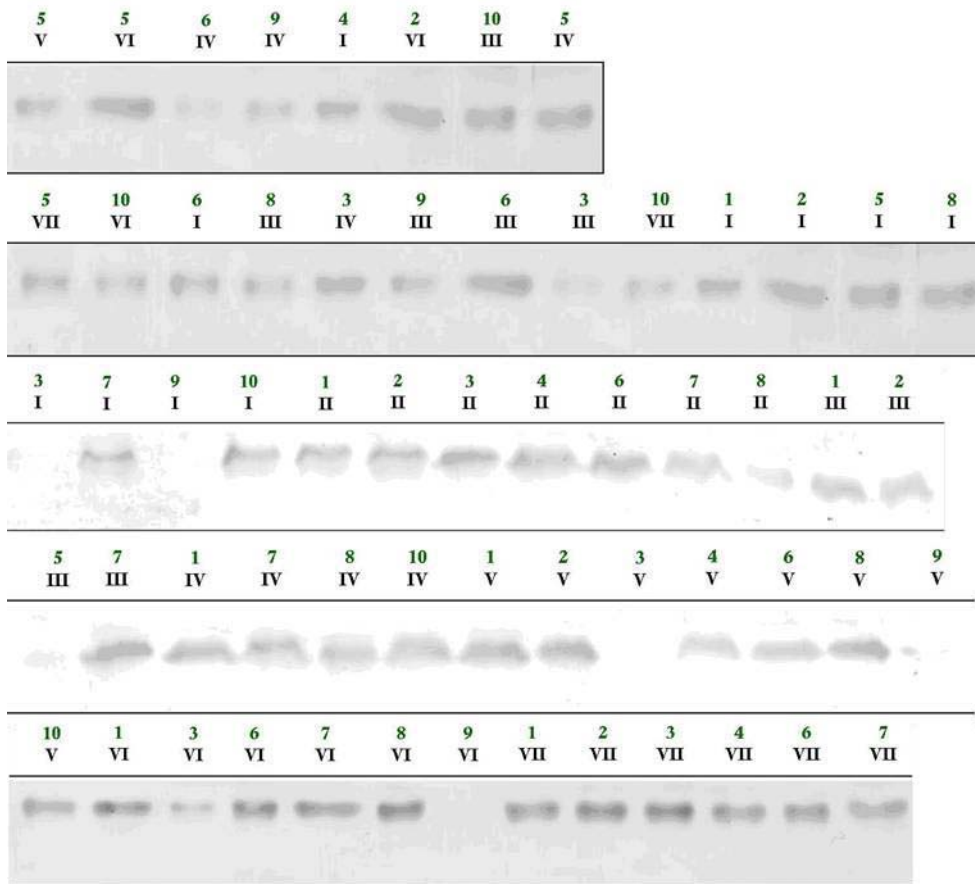


Figura 3. Colorazione con lectina MAA delle AGP purificate dai gatti FCoV-positivi. L'analisi delle bande evidenzia un'ampia variabilità individuale. In alcuni campioni non è stato possibile rilevare il grado di sialilazione. Tali campioni sono quindi stati esclusi dall'analisi statistica.

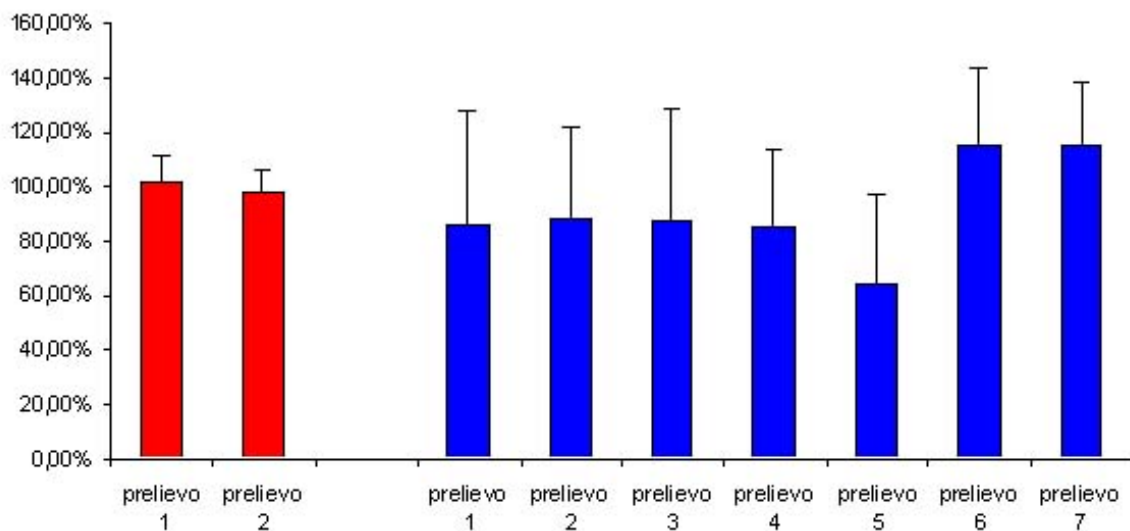


Figura 4. Risultati dell'analisi densitometrica dei Western Blotting riportati in figura 3: il grado di sialilazione nei campioni 6 e 7 è risultato significativamente superiore a quello rilevato nei prelievi precedenti ($P < 0.05$).

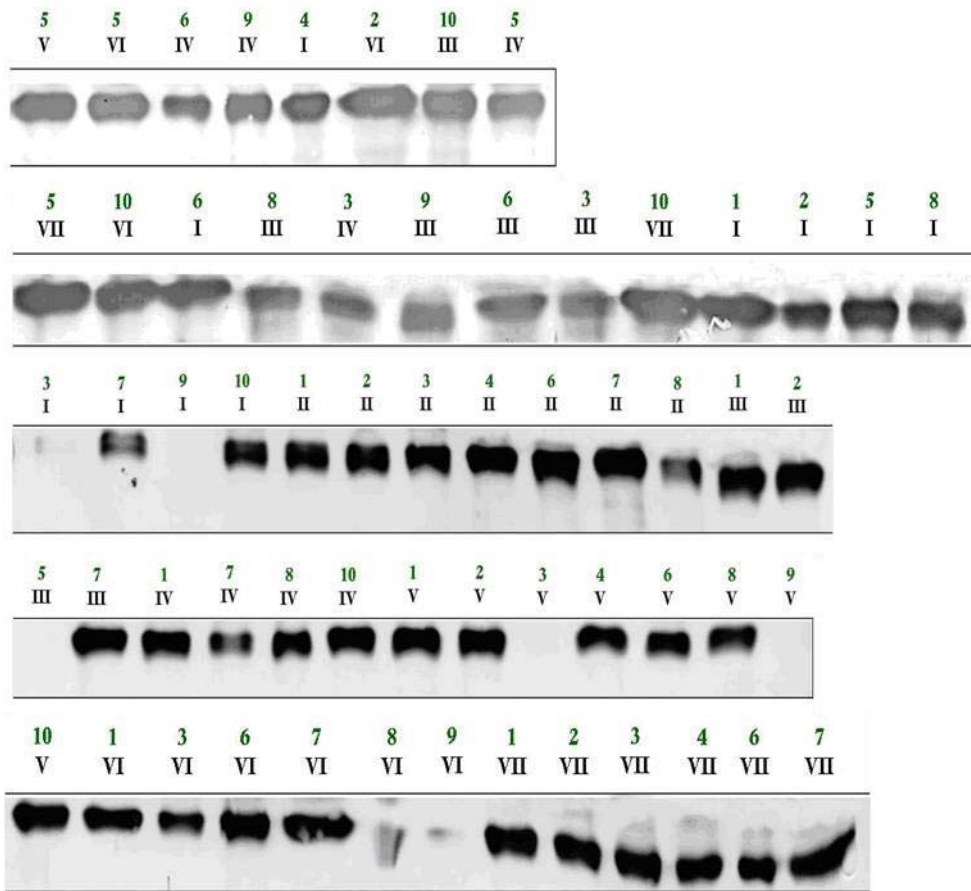


Figura 5. Colorazione con lectina SNAI delle AGP purificate dai gatti FCoV-positivi. Anche in questo caso è presente una notevole variabilità individuale e l'assenza di bande visibili nei campioni già risultati negativi in figura 3.

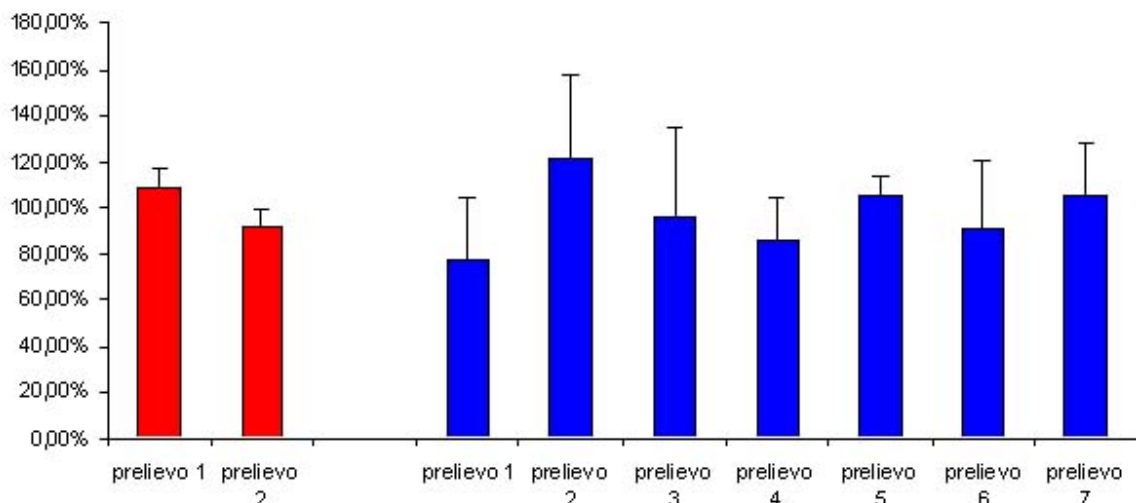


Figura 6. Risultati dell'analisi densitometrica dei Western Blotting riportati in figura 5: il grado di sialilazione nel prelievo 2 è risultato significativamente superiore a quello rilevato al prelievo 1 ($P < 0.05$). I prelievi successivi, pur fluttuando come valori medi, non hanno mostrato differenze significative, probabilmente a causa dell'elevata variabilità individuale.

GLYCOSYLATION PATTERN OF α_1 -ACID GLYCOPROTEIN IN CLINICALLY HEALTHY, FCoV-POSITIVE CATS.

Individual resistance to infectious diseases, in humans, is associated with some glycosylation pattern of α_1 -acid glycoprotein (AGP). AGP persistently increases and is hyposialylated in cats with Feline Infectious Peritonitis (FIP) while transiently increases in non-symptomatic FCoV positive cats, likely in association with increases in viral burden: no information about the glycosylation pattern of AGP from these latter cats are available. In this study 10 clinically healthy, FCoV positive cats were sampled monthly for 7 months. Three SPF cats were sampled twice, as a negative control. At each sampling, AGP was purified, run on a SDS-PAGE and stained with lectins that specifically bind to sialic acid. The intensity of positive bands (which is proportional to the amount of sialic acid) was then densitometrically semiquantified. SPF cats showed only few changes of the glycosylation patterns, while FCoV positive cats showed a wide variability among individuals and samples. Specifically, hypersialylation in position $\alpha(2-6)$ was found on sampling 2 (not associated with increases of viral burden) and in position $\alpha(2-3)$ on sampling 6 and 7, performed close to the occurrence of an episode of FIP in the cattery and of an increase in antibody titer in sampled cats. In conclusion, this study revealed transient hypersialylation, in one case associated with changes of viral burden or of FCoV environmental contamination. The role of these changes in resistance/susceptibility to FIP merits to be further investigated.

Keywords: cat, feline coronavirus, α_1 -acid glycoprotein (AGP), glycosylation.

INDAGINE RETROSPETTIVA SULLA SIEROPOSITIVITÀ PER ORTHOMIXOVIRUS TIPO A NEL GATTO

Paltrinieri Saverio¹, Spagnolo Valentina¹, Giordano Alessia¹, Moreno Martin Ana²,
Luppi Andrea²

¹Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria (DiPaV), Sezione di Patologia Generale e Parassitologia – Via Celoria 10, 20133 Milano

²Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia, Reparto di Virologia e Sierologia Specializzata – Via Bianchi 9, 25125, Brescia

Le aneddotiche segnalazioni di gatti positivi per virus influenzali H5N1 hanno posto il problema del ruolo del gatto nella trasmissione della malattia. Studi sperimentali dimostrano che il gatto è suscettibile all'infezione, ma non si hanno segnalazioni di casi spontanei di malattia. Proprio la mancanza di informazioni in condizioni "di campo", non permette di smentire l'ipotesi della recettività del gatto ai virus influenzali. In caso di suscettibilità anche parziale, però, gli animali venuti in contatto col virus mostrerebbero una sieroconversione. Abbiamo quindi voluto verificare, in sieri felini, l'eventuale presenza di titoli anticorpali anti-nucleoproteina, antigene comune a tutti gli Orthomyxovirus di tipo A, sia aviari che umani, a cui i gatti, soprattutto quelli "di casa", sono con molta probabilità esposti. Dai nostri archivi sono stati selezionati 196 sieri, prelevati da 94 randagi, 54 dei quali clinicamente sani (5 FIV positivi) e 40 sintomatici in quanto affetti da processi infiammatori localizzati (n=27, 7 dei quali FIV-positivi) o sistemici (n=7) o da FIP (n=6), e da 102 gatti di proprietà, 25 clinicamente sani (3 FIV- o FeLV positivi) e 77 con sintomi riferibili a FIP (n=36), forme infiammatorie localizzate (n=18, 4 dei quali FIV-positivi), neoplasie ematologiche (n=8, 1 FIV-positivo) o non ematologiche (n=8), malattie sistemiche infiammatorie o degenerative (n=7, 3 dei quali FIV- e/o FeLV-positivi). La ricerca degli anticorpi con tecnica ELISA competitiva ha dato esito negativo in tutti i soggetti. Sebbene la negatività dei gatti randagi possa essere spiegata con una bassa esposizione al virus, la negatività degli altri soggetti testati conferma che il gatto, in condizioni naturali, anche in ambiente domestico è poco suscettibile a virus influenzali tipo A. Tali risultati possono servire da base per confrontare, in futuro, l'assetto sierologico di animali viventi in aree esposte a virus aviari.

Parole chiave: orthomyxovirus tipo A, influenza, gatto, ELISA, monitoraggio sierologico

INTRODUZIONE

Dopo gli episodi di mortalità per virus influenzale H5N1 in felini selvatici ricoverati presso giardini zoologici dell'estremo oriente,¹ nella primavera 2006 è risultato positivo per H5N1 in un gatto trovato morto in Germania in un'area insulare dove si erano registrati diversi casi di positività per H5N1 in uccelli selvatici.^{2,3} Tale aneddotica segnalazione però non è supportata da riscontri scientifici che provino che il gatto possa avere un ruolo epidemiologicamente importante nella diffusione della malattia. Esistono, però, prove scientifiche che dimostrano che il gatto si può comportare da ospite "aberrante" dei virus influenzali ad alta patogenicità, alla stregua dell'uomo ed altri felini e mammiferi, può ammalarsi e trasmettere l'infezione in condizioni sperimentali,^{4,5} tuttavia raramente riproducibili in natura.

Proprio la mancanza di informazioni in condizioni "di campo", non permette di smentire l'ipotesi della recettività del gatto ai virus influenzali. L'unica prova a favore della bassa suscettibilità del gatto in condizioni naturali risiede nel fatto che le segnalazioni "scientificamente validate" di patologia spontanea sono rare,⁶⁻⁸ e ancora più rare, e limitate a situazioni epidemiologiche molto particolari, quelle relative alle sieropositività di gatti per Orthomyxovirus tipo A.⁹

Se però il gatto fosse almeno parzialmente suscettibile a tali virus, in seguito ad infezione gli animali svilupperebbero una risposta immunitaria sia in presenza che in assenza di sintomatologia clinica, contrariamente a quanto osservato nelle forme fulminanti da H5N1 riprodotte in laboratorio, nelle quali gli animali sono deceduti prima della sieroconversione. In questo scenario, i soggetti immunodepressi o affetti da altre malattie

sarebbero più sensibili e più probabilmente sieropositivi.

Il presente lavoro ha lo scopo di verificare se fossero presenti titoli anticorpali anti-Orthomixovirus tipo A (comune sia ai virus dell'influenza aviaria che ad alcuni dei ceppi virali dell'influenza umana cd "stagionale")¹⁰⁻¹² in sieri stoccati presso il DiPaV e riferiti sia a gatti di proprietà che gatti randagi o semirandagi e sia a gatti clinicamente sani che a gatti con patologie diverse, incluse forme di immunodepressione da virus dell'immunodeficienza felina. In caso di positività sierologica agli antigeni di gruppo (nucleoproteina tipo A o NPA) ci si propone di procedere all'identificazione degli anticorpi sottotipo-specifici tramite inibizione dell'emoagglutinazione.

MATERIALE E METODI

1) *Selezione dei campioni:* dagli archivi della Sezione di Patologia Generale Veterinaria del DiPaV sono stati selezionati i campioni di siero di gatto ricevuti nel periodo 1999-2005 nell'ambito dell'attività di routine, rivolta sostanzialmente al monitoraggio sanitario di gattili e a studi patogenetici e diagnostici di stati infiammatori e di neoplasie ematologiche del gatto. In particolare sono stati inclusi nel presente lavoro i campioni di cui erano disponibili informazioni circa l'ambiente di provenienza e lo stato di salute, sia in termini di condizioni generali che di presenza di patologie specifiche, anche clinicamente inapparenti. Un ulteriore criterio di inclusione è stato infatti quello di selezionare solo animali dei quali fosse noto lo stato sierologico per i virus dell'immunodeficienza felina (FIV) e per la leucemia virale felina, o che fossero disponibili informazioni circa il quadro ematologico o elettroforetico

2) *Ricerca degli anticorpi anti-Orthomixovirus tipo A:* i sieri oggetto della nostra indagine sono stati testati utilizzando un test immunoenzimatico di tipo ELISA competitivo per l'identificazione di anticorpi anti-NPA dei virus influenzali¹³ tipo specifici. Il protocollo operativo ha previsto l'adsorbimento in piastre microtitre con un virus influenzale tipo A parzialmente purificato, l'impiego dei sieri in

esame e dei sieri di controllo positivo e negativo in due diluizioni (1/10 e 1/20), e l'utilizzo dell'anticorpo monoclonale (Mab) HB65 ATCC, coniugato con perossidasi.

RISULTATI

1) *Classificazione degli animali:* 196 animali rispondevano ai criteri di inclusione sopra specificati e sono stati suddivisi nei gruppi riportati in tabella 1.

Dei soggetti esaminati, 102 animali erano gatti di proprietà, 25 dei quali asintomatici, tra i quali erano però presenti 2 soggetti positivi a FIV ed 1 a FeLV. I restanti gatti di proprietà erano sintomatici, affetti da FIP (36 casi), flogosi localizzate con moderate ripercussioni sistemiche (18 casi), neoplasie ematologiche (8 casi) e non ematologiche (8 casi) e malattie degenerative/metaboliche sistemiche (7 casi). Tra gli animali sintomatici, 7 erano positivi a FIV e 1 sia a FIV che a FeLV.

I rimanenti 94 soggetti erano randagi, in prevalenza asintomatici (54 gatti, 5 dei quali FIV-positivi) e 40 sintomatici, per lo più affetti da processi infiammatori locali (27 casi) o sistemiche (7 casi) o da FIP (6 casi)

2) *Analisi sierologica:* Tutti i soggetti esaminati sono risultati negativi per anticorpi anti-Orthomixovirus tipo A per cui non è stato necessario ricorrere all'identificazione degli anticorpi sottotipo-specifici tramite inibizione dell'emoagglutinazione.

DISCUSSIONE

L'indagine sierologica è stata eseguita utilizzando un test ELISA in grado di rilevare anticorpi verso tutti i virus influenzali tipo A in sieri di diverse specie animali, compreso l'uomo¹³ e pertanto, anche se non si disponeva di campioni prelevati da gatti sicuramente infetti da includere nel test come controllo positivo, è altamente improbabile che la negatività riscontrata in tutti gli animali sia in realtà una "falsa negatività". E' invece probabile che gran parte dei soggetti inclusi nel presente campionamento siano negativi perché poco o per nulla esposti al virus: è il caso dei

gatti randagi, la gran parte dei quali non è probabilmente mai entrata in contatto col virus, visto che non sono mai stati segnalati focolai influenzali in animali selvatici e domestici, nella loro zona di provenienza,¹⁰ e che il contatto di questi gatti con esseri umani potenziali portatori di Orthomyxovirus tipo A è probabilmente stato molto limitato. Nel caso dei gatti di proprietà, invece, l'esposizione a virus influenzali di tipo A è altamente probabile, visto che circa la metà dei virus influenzali umani isolati in Europa, e in particolare in Italia, è di tipo A.^{11,12} La convivenza con i proprietari ha quindi probabilmente esposto a virus di tipo A questi animali ma ciò nonostante nessuno di loro ha mostrato sierconversione, né tra gli animali in buono stato di salute né tra quelli con malattie intercorrenti e/o immunodepressanti. Questo supporta l'ipotesi della resistenza del gatto, in condizioni naturali, agli Orthomyxovirus tipo A, quantomeno a quelli umani (es. H3N2), che anche in condizioni sperimentali non hanno dato sintomi o lesioni nel gatto, come invece è successo per il virus influenzale aviario ad alta patogenicità H5N1.⁴

CONCLUSIONE

I risultati del presente lavoro supportano l'ipotesi di una scarsa sensibilità del gatto agli Orthomyxovirus tipo A fino ad ora presenti sul territorio e possono servire da base per confrontare in futuro, l'assetto sierologico di

animali viventi in aree esposte a virus aviari, siano essi a bassa o ad alta patogenicità.

BIBLIOGRAFIA

1. Amonsin A et al., 2006 Genetic characterization of H5N1 influenza A viruses isolated from zoo tigers in Thailand. *Virology*. 344:480
2. <http://www.promedmail.org>
3. http://www.who.int/csr/don/2006_02_28a/en
4. Kuiken T et al., 2004 Avian H5N1 influenza in cats, *Science*, 306:241
5. van Riel D et al., 2006. H5N1 Virus Attachment to Lower Respiratory Tract. *Science*, 312:399
6. Paniker CK Nair CM., 1970. Infection with A2 Hong Kong influenza virus in domestic cats. *Bull WHO* 43:859
7. Butler D, 2006. Can cats spread avian flu? *Nature* 440:135
8. Songsermn T et al. 2006 Avian influenza H5N1 in naturally infected domestic cat. *Emerging Infectious Diseases*. 12:681
9. Butler D, 2006 Thai dogs carry bird-flu virus, but will they spread it? *Nature* 439, 773; 2006
10. www.oevr.org
11. <http://www.ministerosalute.it/promozione/malattie/virologica.jsp>
12. <http://www.eurosurveillance.org/ew/2006/060413.asp>
13. De Boer GF et al., 1990. An ELISA for detection of antibodies against influenza A nucleoprotein in humans and various animal species. *Arch Virol*, 115:47

GATTI DI PROPRIETA'						
asintomatici	25					FIV 2
						FeLV 1
sintomatici	77	FIP	36			
		processi infiammatori localizzati	18	Intestinali	5	
				Respiratori	4	
				Stomatiti	3	FIV 2
				Neurologici	3	FIV 2
				Piometra	1	
				Cistite	1	
				Pancreatite	1	
		Neoplasie ematologiche	8	Linfoma	5	FIV 1
				Sindrome mielodisplastica	1	
				Leucemia mieloide acuta (AML6)	1	
				Leucemia linfoide acuta (ALL)	1	
		tumori non ematologici	8	Carcinomi	3	
				Fibrosarcomi	3	
				Mesotelioma	1	
				Mastocitoma	1	
		Malattie sistemiche infiammatorie o degenerative	7			FIV 2
						FIV e FeLV 1
GATTI RANDAGI						
asintomatici	54					FIV 5
sintomatici	40	processi infiammatori localizzati	27	Respiratorie	10	FIV 2
				Congiuntivali	8	
				stomatiti	6	FIV 5
				Intestinali	3	
		Malattie sistemiche infiammatorie o degenerative	7			
		FIP	6			

Tabella 1: Classificazione degli animali campionati, sulla base di patologia e sieropositività per FIV-FeLV.

RETROSPECTIVE INVESTIGATION ON TYPE A ORTHOMYXOVIRUS SEROPOSITIVITY IN CATS

The anecdotal reports of cats positive for H5N1 type A Orthomyxovirus raised the doubt that cats might have an epidemiological role for this disease. Experimental findings support this hypothesis, but no spontaneous cases of transmission have been reported and the susceptibility of cats in field conditions remains to be elucidated. Based on the assumption that susceptible animals should mount an antibody response, we investigated the possible presence, in feline sera, of antibodies against the nucleoprotein A, a common antigen of type A orthomyxoviruses, expressed also by human strains to which domestic cats are likely exposed. Using a competitive ELISA, we analyzed 196 sera stored in our archives and collected from 94 free-roaming cats, 54 of which were clinically healthy (5 positive for FIV) and 40 had local or systemic inflammation (7 FIV-positive), and from 102 pets, 25 of which were clinically healthy (3 FIV- or FeLV-positive) and 77 had symptoms consistent with FIP (n= 36), local inflammation (n=18, 4 of which FIV-positive), haematopoietic (n=8,1 of which FIV-positive) or non-haematopoietic (n=8) tumours, and systemic inflammatory or degenerative diseases (n=7, 3 of which FIV- and/or FeLV-positive). All the cats tested resulted negative. Although the negative results

of free roaming cats might be due to a low exposure to the virus, the negative results in the remaining cats supports the hypothesis of a low susceptibility of cats to type A influenza viruses in field conditions, even in domestic habitats. In futures studies, these results can be used to compare the results of cats living in sites contaminated by avian viruses.

Keywords: type A Orthomyxovirus, influenza, cat, ELISA, serological survey

ESPRESSIONE DELLA CICLOOSSIGENASI-2 NEL CARCINOMA SQUAMOCELLULARE DEL CANE E DEL GATTO

Millanta Francesca, Corazza Michele*, Lorenzi Davide, Poli Alessandro

*Dipartimento di Patologia Animale e * Dipartimento di Clinica Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Pisa*

Il carcinoma squamocellulare (CS) cutaneo è il più frequente tumore maligno nel gatto ed il secondo nel cane. In entrambe le specie mostra notevoli similitudini con quello dell'uomo per l'epidemiologia, le caratteristiche patologiche ed il comportamento biologico. Nell'uomo la Cicloossigenasi-2 (COX-2) ha un importante ruolo nella cancerogenesi di diverse neoplasie e, recentemente, un' aumentata espressione di COX-2 è stata dimostrata in diverse neoplasie del cane e del gatto. In queste specie, al momento, l'espressione di COX-2 nel CS non è stata indagata in maniera approfondita, così come il suo ruolo di indicatore prognostico. Lo scopo della nostra ricerca è stato, quindi, valutare l'espressione di COX-2 in CS cutanei e non-cutanei del cane e del gatto e di verificare le possibili correlazioni tra tale espressione ed alcuni importanti parametri clinico patologici e la prognosi. Sono stati studiati 51 casi di CS, di cui 36 di gatto e 15 di cane. L'espressione di COX-2 è stata valutata mediante immunohistochimica e quantificata secondo linee guida standardizzate. A differenza dei tessuti sani di controllo, COX-2 è risultata sovraespressa nel 60% dei CS di cane e nel 64% di quelli di gatto. L'elevata percentuale di casi positivi suggerisce che sia il cane che il gatto potrebbero rappresentare un valido modello animale per lo studio dell'espressione di COX-2 nel CS dell'uomo ed evidenzia la possibilità di valutare l'impiego di COX-2 inibitori nella terapia di tale tumore anche nella pratica veterinaria.

Parole chiave: COX-2, carcinoma squamocellulare, cane, gatto, prognosi

CYCLOOXYGENASE-2 EXPRESSION IN FELINE AND CANINE SQUAMOUS CELL CARCINOMAS

Cutaneous squamous cell carcinoma (SCC), is the most common malignant tumour in cats and the second most common in dogs. In both species it shares several epidemiologic and pathologic analogies with human SCC and a similar biologic behaviour. Cyclooxygenase-2 (COX-2) plays an important role in the tumorigenesis of a variety of human cancers. Recently, its role has also been investigated in a series of small animal tumours. However, the expression of COX-2 in canine and feline SCCs remains less clear. The purpose of our study was to evaluate COX-2 expression in cutaneous and non-cutaneous spontaneously occurring SCCs of dogs and cats and to investigate its correlation with clinico-pathologic parameters and with the prognosis. Fifty-one SCCs (36 feline and 15 canine) were studied. COX-2 expression was evaluated by immunohistochemistry and quantified according to standardised guidelines. Compared to normal tissues used as controls, COX-2 over-expression was observed in 60% of the canine and 64% of the feline SCCs. The high percentage of positive cases suggests that either dogs and cats may be a suitable animal model to investigate the role of COX-2 in human SCCs, and the reliability of the use of COX-2 antagonists for the therapy of these tumours also in the small animal practice.

Keywords: COX-2, squamous cell carcinoma, dog, cat, prognosis

