

A.P.I.V.  
ASSOCIAZIONE PATOLOGI ITALIANI VETERINARI

# ATTI XIV CONVEGNO NAZIONALE

(Saturnia, 16-18 Marzo 1995)



**ATTI MEETING APIV PRIMAVERILE 1995  
SATURNIA, 16-18 MARZO 1995**

Apertura dei lavori ..... 3

ELENCO DELLE COMUNICAZIONI ORALI

LA PATOLOGIA NELLA PROFESSIONE VETERINARIA  
F. Guarda ..... 5

Sezione: PATOLOGIA ITTICA

MALATTIE DA STRESS AMBIENTALE IN ACQUACOLTURA  
A.M. Cognetti-Varriale e S. Cecchini ..... 13

LA PATOLOGIA DIFFUSIVA NELL'ALLEVAMENTO ITTICO  
C. Giorgetti ..... 29

IL SISTEMA IMMUNITARIO DEI TELEOSTEI  
M. Galeotti ..... 37

PATOLOGIA PARASSITARIA DEI PESCI  
E. Arru, G. Garippa ..... 69

LE NEOPLASIE NEI TELEOSTEI  
S. Biavati, M. Manera ..... 77

STUDI ISTOCIMICI ED IMMUNOISTOCIMICI SULLA MALATTIA PROLIFERATIVA  
RENALE DEI SALMONIDI  
M. Marin De Mateo, S. Adams, M. Castagnaro ..... 87

CONTRIBUTO ALLO STUDIO DELLE NEOPLASIE EPATICHE NEI PESCI  
D'ALLEVAMENTO  
M. Caramelli, E. Bozzetta, M. Prearo, M.C. Bisso, F. Rotili, C. Ghittino ..... 93

INDAGINE ISTOLOGICA E IMMUNOISTOCIMICA IN BRANZINI (*Dicentrarchus labrax*)  
INFETTATI SPERIMENTALMENTE CON *Pasteurella piscicida*  
M. Galeotti, D. Volpatti, N. Del Grano, L.A. Volpelli, G. Ceschia, G. Giorgetti, S. Adams, S.  
Richard ..... 101

NOTE A MARGINE DI ALCUNE LESIONI PARASSITARIE DELLA MUSCOLATURA DEL  
PESCE SPADA (*Xiphias gladius*)  
D. Gelmetti, M.T. Manfredi, G. Cammarata ..... 109

DERMOPATOLOGIA COMPARATA DEI TELEOSTEI  
M. Manera, S. Biavati ..... 119

MODIFICAZIONI POSTMORTALI DEI TELEOSTEI  
S. Biavati ..... 127

Sezione: PATOLOGIA EQUINA

PATOLOGIA DEGLI ORGANI DI MOVIMENTO DEL CAVALLO  
(LE FRATTURE DELLE OSSA LUNGHE)

L. Masetti, M. Joechler ..... 135

L'ALIMENTAZIONE DEL CAVALLO ATLETA

D. Gatta ..... 143

PATOLOGIA NUTRIZIONALE - MODIFICAZIONI DEL PROFILO METABOLICO

A. Buonaccorsi ..... 159

LA PATOLOGIA NEOPLASTICA NEGLI EQUINI. RASSEGNA BIBLIOGRAFICA E  
CONTRIBUTO CASISTICO

G. Bettini, F. Bovenga, P.S. Marcato ..... 163

CONTRIBUTO ALLO STUDIO DELLE ABIOTROFIE DEL CAVALLO

A. Corradi, M. Cantoni, R. Di Lecce, A. Perillo, E. Cabassi ..... 177

METODICA DI DOSAGGIO DEI GLICOSAMINOGLICANI SOLFATI NEL LIQUIDO  
SINOVALE DI CAVALLO: PROSPETTIVE PER LO STUDIO DELLA PATOLOGIA DELLA  
CARTILAGINE ARTICOLARE

P. Borghetti, F.M. Martini, E. De Angelis ..... 187

CONTRIBUTO ALLA CONOSCENZA DEI TUMORI PLACENTARI DEGLI EQUINI

G. Cammarata, G. Sironi, P. Riccaboni, D. Como ..... 193

UTILIZZAZIONE DELL'ANTICORPO MONOCLONALE MIB 1 PER LA RICERCA  
DELL'ANTIGENE KI-67 NEI TESSUTI NORMALI E NEOPLASTICI DI CAVALLO

G. Sironi, P. Riccaboni ..... 199

RICERCHE ANATOMO-PATOLOGICHE SULLE PIU' COMUNI ALTERAZIONI DELLO  
STOMACO DEL CAVALLO

G. Mandelli, F. Grignani, E. Scanzani, F. Enice, G. Cicognetti ..... 205

INDAGINE RETROSPETTIVA (1988-1994) SULLA PATOLOGIA NEOPLASTICA DEL  
CAVALLO

G. Ru, M.G. Canese, A. Donn, C. Rattazzi, F. Guarda ..... 233

STUDIO ISTOCHEMICO, IMMUNOISTOCHEMICO ED ULTRASTRUTTURALE DI UN  
ADENOMA PSEDOCROMOFORO IPOFISARIO (SILENT "CORCOTROPH" ADENOMA  
SUBTYPE 2) DELLA PARS INTERMEDIA IN UN CAVALLO

G. Rossi, V. Nardini, C.G. Vitali, E. Taccini, C. Cantile, G. Braca, G. Renzoni ..... 237

Sezione: PATOLOGIA DELLA RIPRODUZIONE NEGLI OVINI E NEI CAPRINI

PATOLOGIA INFETTIVA: BRUCELLOSI E LEPTOSPIROSI

R. Farina ..... 249

PATOLOGIA DELL'APPARATO RIPRODUTTORE DEGLI OVI-CAPRINI CAUSATA DA  
CLAMIDIA E DA CAMPILOBACTER

E. Andreani .....	255
<b>PARASSITOSI E ATTIVITA' RIPRODUTTIVA DEGLI OVINI</b>	
E. Arru, S. Pau .....	263
<b>APPARATO GENITALE FEMMINILE DELL'OVINO SARDO: ALTERAZIONI ANATOMO PATOLOGICHE E IPOFECONDITA'</b>	
A. Leoni, S. Pau, M.T. Zedda, A.M. Nieddu .....	273

## XIV Convegno A.P.I.V.

Prof. **Giovanni Braca**: Apertura dei Lavori

*Un benvenuto a tutti i Soci e simpatizzanti*

Aprendo i lavori di questo XIV Convegno primaverile della nostra Associazione sento innanzi tutto il dovere di spiegare ai presenti i motivi della scelta di Saturnia come sede di questo incontro. Già l'anno scorso la scelta era caduta su una cittadina, Volterra, di alto interesse storico-ambientale appartenente alla cosiddetta Toscana "minore". La positività dell'esperienza passata mi ha spinto ad un esperimento ancor più "difficile", e così la sede del XIV Convegno, come vi siete o vi state accorgendo è caduta su questo paese di non più di 250 abitanti -un record credo-, in condizione però di ospitare il nostro convegno con una attrezzatura sobria, schietta, quasi silvestre, in perfetta sintonia con la maremma toscana che ci circonda.

Siamo qui infatti al confine sud della Toscana -altro fattore che mi ha condizionato a dimostrare l'intenzione di avvicinarmi ai colleghi del Sud che troppo spesso devono compiere lunghi viaggi per partecipare ai congressi delle diverse società scientifiche veterinarie- al centro dell'Etruria (Sovana, Pitigliano, Sorano ecc.), in un ambiente agrozootecnico (allevamenti ittici, ovini ed equini in forte incremento) in parallelo sviluppo con un agriturismo di intensa attrazione.

La rispondenza dei temi che tratteremo, vuoi quelli a puro sfondo patologico, vuoi quelli di discipline collaterali e complementari, con le sentite esigenze di aggiornamento scientifico-culturale, spiega ulteriormente questa mia scelta. La realizzazione poi è stata possibile sia per l'intenso impegno di alcuni miei collaboratori (in primis la gentile segreteria della Prof.ssa Benazzi ma anche il prezioso intervento locale di Arispici, Renzoni, Taccini, Rossi, Gianfaldoni, Vitali) sia per il gradito aiuto di alcune, poche, istituzioni pubbliche e private, che ho il piacevole dovere di ringraziare ufficialmente:

-il Magnifico Rettore ed il Consiglio di Amministrazione della Università di Pisa che ha condiviso la mia scelta ed ha contribuito concretamente;

- Il Consiglio Nazionale delle Ricerche che, al momento in forma solo ufficiosa, ma spero in seguito anche in maniera del tutto concreta, dovrebbe sostenere le spese della stampa degli atti congressuali;

- alcuni ordini professionali della Toscana (Grosseto, Pisa e Lucca) nelle

persone dei loro Presidenti (Dr. Focacci, Della Sala e Rovai) che mi hanno aiutato nelle fasi organizzative e promozionali dell'iniziativa;

- la Banca di Credito Cooperativo di Saturnia che localmente ha rappresentato per noi il mezzo più efficace per risolvere problemi logistici. La stessa sede che ci ospita è la sua sala di riunione; un ringraziamento personale al Sig. Luigi Bartalini incaricato della stessa, ai giovani della Pro-loco di Saturnia ed allo studente De Angelis che con estrema gentilezza hanno contribuito in tutti i modi possibili a risolvere le non poche difficoltà locali;

- scarsissima, per non dire del tutto negativa, la risposta degli enti locali (Comune, Provincia, Usl, Associazioni ed enti pubblici) imbrigliati da strette normative e situazioni di crisi finanziaria;

Con tutto ciò il Convegno è venuto alla luce e tocca a ciascuno di noi, in questi tre giorni, contribuire alla sua migliore riuscita.

Come vedete, accanto ai momenti di impegno scientifico sono previste attività sociali: gita a Sovana, paese etrusco di richiamo mondiale, ed a Pitigliano, che con il suo sperone tufaceo ha tuttora vivi ricordi di enclave ebraica in Toscana, visita ed utilizzo degli impianti termali idro-solfurei di Saturnia ed ampie possibilità di attività agro-turistiche.

Alla fine dei tre giorni congressuali saremo in condizione di verificare se gli obbiettivi prefissati saranno stati raggiunti e ne verificheremo in assemblea le risultanze.

Di nuovo un caloroso benvenuto a tutti, soprattutto alle nuove leve della patologia veterinaria italiana, che vedo particolarmente presenti ed a cui sono indirizzati gli interessi primari della nostra società, un ringraziamento ai docenti delle discipline collaterali ed un buon lavoro a tutti.

# LA PATOLOGIA NELLA PROFESSIONE VETERINARIA

GUARDA F.

*Dipartimento di Patologia Animale - Torino*

I motivi che hanno indotto l'APIV a presentare in forma di relazione introduttiva a questo congresso primaverile il dibattito sulla Patologia nella professione veterinaria sono a mio parere duplici:

- a) verificare innanzitutto, alla luce dell'evoluzione scientifica, se l'eredità degli illustri predecessori Morgagni, Virchow, Kitt, Joest, Nieberle, Cohrs, Ercolani, Gherardini, Montroni, Leinati, Romboli e Barboni sia stata onorevolmente conservata e tramandata alla popolazione veterinaria italiana;
- b) verificare il ruolo che nella realtà veterinaria italiana, sia in ambito accademico sia professionale, è oggi attribuito alla patologia.

Per questi motivi ritengo anzitutto opportuno chiarire, anche se apparirà ovvio alla maggior parte degli addetti ai lavori, il concetto di Patologia Veterinaria.

Questa infatti non è senz'altro identificabile nella sola Patologia Generale + Anatomia Patologica come si intende comunemente, ma è comprensiva di un ampio gruppo di discipline di studio, di insegnamento, di ricerca e soprattutto di attività che sia, a livello universitario, sia nella professione affrontano anche tematiche e attività di sanità animale e di sanità pubblica.

Dal gruppo di materie di base, concentrate sulla *patologia generale veterinaria*, la *fisiopatologia degli animali domestici*, la *patologia comparata*, la *immunopatologia veterinaria*, si passa infatti alle scienze fondamentali della *morfo-patologia* nelle varie articolazioni dell'anatomia *patologica*, *l'istologia patologica*, *l'istochimica*, *l'immunoistochimica*, fino alle discipline relative alle applicazioni diagnostiche pratiche quali la *tecnica delle autopsie e diagnostica cadaverica*, la *citodiagnostica*, *l'oncologia veterinaria*, la *teratologia*, *l'ittiopatologia*, la *patologia della selvaggina* etc.

In tutto questo ampio panorama di scienze e di attività strettamente e reciprocamente concatenate nelle diverse componenti, ognuno di noi deve ve-

dere un unico corpo organico che solo l'ampiezza delle tematiche oggi amplificate a dismisura dai mezzi e dalle acquisizioni scientifiche, ha suddiviso e precisato nelle diverse sfaccettature.

E' ormai noto infatti a tutti i cultori della medicina veterinaria che la trasformazione degli allevamenti da familiari ad intensivi ha provocato in questi ultimi anni una grande evoluzione dei sistemi di allevamento delle varie specie animali: l'alimentazione, la genetica, il grande numero di animali in spazi relativamente ristretti, stress ambientali e sociali più incisivi e duraturi per tutta la vita economica, sistemi di vaccinazioni multipli e ravvicinati, tutti fattori decisivi al fine di ottenere il massimo rendimento nel minor tempo possibile.

Tutto questo ha significato una correlata evoluzione della "patologia classica", poco mutabile nel tempo, alla patologia cosiddetta da civilizzazione, con scomparsa di determinate malattie, l'avvento di nuove patologie o per lo meno espressioni morfologiche diverse provocate dagli stessi agenti eziologici di fronte a un terreno organico differente.

Ciò vuol dire un continuo aggiornamento culturale, un continuo studio per affrontare e risolvere le nuove e attuali problematiche, in altre parole è necessaria una educazione permanente nella patologia.

Basta pensare a questo proposito agli insulti patogeni che si creano con il trasporto anche aereo di animali non solo da stato a stato ma da continente a continente, con la selezione spinta, con i progressi della genetica.

Io credo che tutti i patologi qui presenti si siano accorti nel loro lavoro routinario che stanno aumentando sempre di più le malattie dei nostri animali per le quali le tecniche usate nella patologia veterinaria o sono le più veloci per arrivare alla diagnosi o sono le uniche che permettono la diagnosi anche eziologica: basta pensare alle malattie da accumulo lisosomiale del bovino, del cane, del gatto, delle pecore, alle malattie carenziali vecchie e nuove, - tipo la miodistrofia delle varie specie animali domestiche e selvatiche -, alla encefalomalacia del pulcino, alla diatesi essudativa, alla gangrena alare del pollo, alla encefalopatia spongiforme del bovino, alla scrapie dell'ovino e l'elenco potrebbe continuare a lungo.

D'altra parte possiamo dire con orgoglio che anche la patologia veterinaria ha subito un'analogia evoluzione, ed ha fatto sue, impadronendosi, le nuove tecniche di ricerca per essere all'altezza della situazione.

Basta pensare a questo proposito alle nuove tecniche istochimiche, enzimatiche e immunologiche, alla microscopia elettronica a trasmissione o a scansione, per porre in evidenza l'eventuale presenza di agenti eziologici

direttamente nei tessuti; consideriamo inoltre il microscopio multifocale per ottenere una figura tridimensionale, le tecniche di biologia molecolare applicate alla patologia quali la PCR e lo studio del genoma. E' chiaro che queste nuove tecniche non appartengono soltanto alla patologia. I cultori della biologia e i patologi le usano e le utilizzano non solo per la diagnosi, ma per capire meglio quei fenomeni biologici che sino a poco tempo fa ci sfuggivano completamente.

Da tutto quanto esposto emerge una conclusione chiara e netta: la patologia non è soltanto più una scienza finalizzata alla diagnosi macroscopica, istopatologica o ultrastrutturale, ma riconosce il fine di studiare il meccanismo d'azione, la patogenesi e l'eziologia delle alterazioni riscontrate.

Pertanto da scienza eminentemente morfologica come si intendeva agli inizi del secolo, attraversato uno stadio biochimico-funzionale come si intendeva sino a non molto tempo fa, si sta trasformando in una scienza complessivamente dinamica e questo è forse il migliore successo realizzato in questi ultimi anni!

Veniamo ora a rispondere al secondo quesito: il ruolo della patologia nella realtà professionale e accademica. La realtà attuale nella pratica veterinaria è notevolmente diversa tanto che spesso i colleghi pratici non conoscono addirittura le modalità di invio del materiale patologico, oltre naturalmente a quella percentuale di superficiali, mancanti di interessi scientifici, che non si preoccupano neppure di andare a fondo del problema diagnostico.

Parlando di pratica veterinaria come si può tacere o trascurare il problema dell'importanza della patologia nella ispezione delle carni?

Su questo complesso problema, devo premettere la mia grande stima, il mio massimo rispetto verso gli amici e colleghi ispettori degli alimenti, conscio dei grandi e gravosi problemi che essi devono risolvere nel loro lavoro quotidiano; oserei dire di più: l'ispezione degli alimenti dovrebbe essere la punta di diamante e la bandiera della Medicina Veterinaria di fronte alla salvaguardia della salute umana.

Ma anche in questi ultimi tempi, anche se detti sottovoce, si sentono discorsi strani da parte di alcuni, come per esempio che *"la patologia non ha più alcuna importanza nella ispezione degli alimenti; sono sufficienti gli esami batteriologici e quelli tossicologici per risolvere i problemi ispettivi"*. Non voglio e non mi sento in grado di dare consigli ai colleghi ispettori perchè mi sento profondamente patologo e per nulla ispettore, ma vorrei soltanto ricordare, dirvi con affetto, puntualizzando due considerazioni:

- 1) senza uno screening anatomico-patologico o senza per lo meno usare criteri e tecniche della anatomia patologica al macello, non si può fare la vera ispezione delle carni. Fa sorridere il fatto che l'ispezione abbia subito anch'essa nel corso degli anni una evoluzione che è andata di pari passo con progressi scientifici, facendo tesoro di tutte le nuove conoscenze che si sono acquisite, mentre la manualità ispettiva è di poco cambiata dal tempo degli aruspici!

Capisco perfettamente che per gli animali provenienti da allevamenti intensivi e macellati negli stabilimenti con catene di macellazione veloci lo standard della visita anatomico-patologica debba poggiare forse su altri criteri. Non sono però d'accordo sull'affermare che l'esame anatomico-patologico non è in grado di tutelare adeguatamente la salute umana. E' altrettanto vero che la patologia non è l'ispezione.

Ovviamente la patologia non può risolvere tutti problemi e come tutte le scienze ha i suoi limiti, quindi non fa miracoli ma può portare il suo contributo. Dobbiamo intendere l'ispezione degli alimenti come l'apice di una piramide nella quale sono riassunte e condensate tutte quelle branche della biologia e della patologia utili per porre una diagnosi il più precisa ed aderente alla realtà: dalla microbiologia alla tossicologia, alla parassitologia, alla biochimica, alla virologia e naturalmente non ultima la patologia.

- 2) Sia ben chiara a questo proposito una verità sacrosanta che sfido a contraddire, che è dura a dirsi ma in coscienza ritengo opportuno esprimere almeno come convinzione personale: se eliminiamo le modalità e i criteri anatomico-patologici come primo screening, l'ispezione stessa potrebbe non appartenere più alla Medicina Veterinaria, ma sarebbe terreno di conquista dei medici, dei chimici, dei biologi, degli agronomi, dei cultori delle produzioni animali: tutti laureati che possono forse anche meglio dei veterinari, condurre sugli alimenti le diverse analisi di laboratorio e non, ma che in ogni caso non hanno la preparazione scientifica e la impostazione applicativo-sanitaria del veterinario. Costui, possedendo infatti appropriate conoscenze di patologia, deve essere considerato l'unico, fra tutti i laureati, in grado di poter ricostruire e diagnosticare la sanità o meno di un dato alimento quanto meno nelle fasi primarie della filiera produttiva.

A conferma di quanto detto il nuovo regolamento dell'ispezione sanitaria delle carni (D.L. 286 del 18-4-1994) recependo le direttive CEE pone in evidenza ancora una volta l'importanza della diagnosi anatomopatologica nell'ambito dell'ispezione delle carni.

Per quanto riguarda infine gli aspetti accademico-universitari, se si vuol eseguire uno sguardo critico *super partes*, per quanto possibile, perchè siamo tutti coinvolti, il peso specifico della patologia veterinaria nella attuale situazione della medicina veterinaria italiana è notevolmente, gravemente scarso. Noi stessi dobbiamo innanzitutto fare un esame di coscienza.

Dopo il Leinati ed il Romboli sino ad ora nessun patologo è mai entrato negli organismi nazionali decisionali sulla politica veterinaria, sulla attività e sulla struttura della didattica universitaria né nella vita delle "federazioni medico-veterinarie" salvo il Prof. Braca, membro attuale della FNOVI.

Bastano pochi esempi esplicativi a questo riguardo: nelle varie commissioni di studio che si sono susseguite nel tempo a sfornare i vari ordinamenti didattici delle nostre facoltà non è stato mai compreso un patologo; da tempo ormai nessun patologo è stato preside delle nostre facoltà, nessun patologo è stato presente nelle commissioni per la ricerca scientifica del M.U.R.S.T., nessun patologo è stato presente nel Consiglio Universitario Nazionale. Ciò ha prodotto situazioni estremamente gravi. Qualche esempio eclatante: nella scuola di specializzazione in Sanità Animale di Torino - per fortuna oggi non più attivata - non è mai stato attivato nessun insegnamento di patologia animale, forse perchè in quella scuola si insegna che tutti gli animali ammalati guariscono spontaneamente?

Personalmente non riesco a concepire come un clinico, un chirurgo, un infettivista, un ispettore, addirittura uno zootecnico possano essere buoni professionisti nel loro campo senza una base culturale di patologia. Mi sembra un controsenso dover pensare che quando il chirurgo sta operando non sappia emettere un sospetto diagnostico intra-operatorio per dover asportare su base più o meno larga la parte patologica oppure che il clinico sulla base della sintomatologia riscontrata non sappia ricostruire mentalmente il processo patologico che sta avvenendo in un certo organo o tessuto.

A questo proposito vorrei ribadire come siano importanti i rapporti di collaborazione tra il clinico ed il patologo. Soltanto una stretta intesa, ciascuno per la propria competenza, può portare alla risoluzione dei problemi diagnostici.

D'altra parte dobbiamo guardare al futuro e preparare le nuove leve dei patologi veterinari alle esigenze diagnostiche dei colleghi pratici e alle nuove problematiche che si prospetteranno nella medicina veterinaria. Sotto questa luce mi permetto di sottolineare gli sviluppi che si prospettano nei prossimi anni e cioè:

- 1) l'oncologia veterinaria nei suoi multiformi aspetti, diagnostici, prognostici, di biologia molecolare e di immunopatologia;
- 2) la neuropatologia veterinaria: basta pensare a questo proposito che nei prossimi mesi almeno una decina di colleghi clinici italiani specialisti nei piccoli animali si diplomeranno in neurologia veterinaria in ambito europeo e avranno bisogno di un valido appoggio neuropatologico;
- 3) la patologia degli animali selvatici, in continua espansione per i multiformi interessi, ecologici, ambientali, igienico-sanitari. E' sufficiente pensare che non è possibile una valida gestione della fauna selvatica senza una adeguata conoscenza della relativa patologia.
- 4) l'ittiopatologia, ormai affermatasi come branca indipendente che ha ed avrà sempre in futuro un maggior sviluppo poiché è noto a tutti che con l'acquacoltura si può ottenere una grande quantità di alimento al prezzo più basso

Altri ancora possono essere gli sviluppi della moderna patologia veterinaria, ma non voglio annoiarvi. Certamente per i giovani patologi veterinari il lavoro non mancherà!

Concludendo ritengo doveroso, da un lato riconoscere i rilevanti progressi scientifici della Patologia che ne hanno sottolineato il ruolo indelebile nello studio, nella ricerca, e nell'integrazione dinamica delle entità patologiche in continuo divenire, dall'altro lamentare per motivi vari un certo degrado della considerazione a livello professionale ed universitario con grave danno e sottovalutazione della Patologia nella politica veterinaria italiana. Questa infine mi sembra l'occasione più propizia per invitare tutti gli addetti ai lavori, cioè tutti noi, ad un maggiore impegno, in qualsiasi ruolo rivestiamo, al fine di riportare la patologia alla considerazione ereditata dei nostri Maestri.

# MALATTIE DA STRESS AMBIENTALE IN ACQUACOLTURA

COGNETTI-VARRIALE A.M.<sup>1</sup> & CECCHINI S.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Patologia Animale, Profilassi ed Igiene degli Alimenti, Pisa  
<sup>2</sup> Dipartimento di Scienze delle Produzioni Animali, Potenza

Tra le malattie a carico dei pesci di allevamento, particolare attenzione deve essere posta a quelle non riconducibili ad agenti biologici. Spesso infatti sono le condizioni ambientali errate che determinano lo sviluppo di una patologia, alterando *in primis* l'omeostasi del pesce.

Per lo sviluppo di una malattia parassitaria, ad esempio, si riconoscono fattori concomitanti (scarso ricambio idrico, eccessiva densità animale, temperature più favorevoli per il ciclo biologico del parassita, che se evitati mantengono la popolazione parassita in equilibrio con l'ospite (il pesce) senza che appaiano chiari segni di malattia.

Ciò accade anche per tutte le *noxae* batteriche considerate patogeni secondari, come ad esempio le vibriosi, che determinano malattia solo nel caso in cui il pesce si trovi in uno stato di immuno-alterazione, non in grado cioè di rispondere con sufficiente "vigore" alle pressioni determinate dall'ambiente.

E' lo stato di stress quindi con le sue reazioni a cascata, ad influenzare negativamente le possibilità modulatrici della risposta organica, per cui per stress deve intendersi "l'azione di uno o più agenti esogeni che determinano nell'animale alcune reazioni fisiologiche per mezzo delle quali il soggetto cerca di mantenere o ristabilire l'omeostasi".

Cause comuni di stress in allevamento intensivo sono le alterazioni delle costanti chimicofisiche delle acque, le manipolazioni a cui comunemente sono sottoposti i soggetti, gli errori dietetici, alcuni trattamenti terapeutici ed in generale lo stress sociale, dovuto principalmente all'eccessiva densità animale o alla disomogeneità degli animali in vasca.

In presenza di un agente stressante, il pesce risponde con un meccanismo biochimico noto come "Sindrome generale di adattamento", tendente all'adeguamento fisiologico verso la nuova condizione ambientale.

I meccanismi fisiologici scatenati in risposta allo stress risultano essere prevalentemente di natura ormonale. Lo stimolo stressante porta infatti attraverso la via ipotalamica, alla increzione di corticosteroidi endogeni e di catecolamine (effetto primario dello stress) a cui seguono "a cascata" gli effetti sull'organismo di tali sostanze ormonali (effetto secondario) tra cui si ricordano i principali: tachicardia, tachipnea, iperglicemia, alterazioni dell'equilibrio elettrolitico, aumento degli acidi grassi liberi nel plasma, diminuzione del glicogeno epatico, leucopenia, diminuzione delle proteine muscolari ed immunodepressione. Qualora tale adattamento non venga raggiunto per stress eccessivamente violento o per stress cronico, si giunge alla fase di esaurimento della capacità di risposta (effetto terziario), che si traduce in degenerazione del tessuto interrenale, comparsa di lesioni di immunosoppressione e morte (figura n° 1).

Delle malattie non contagiose è possibile identificare come cause eziologiche:

- 1) fattori ambientali inidonei riferiti principalmente ad alterazioni dei parametri chimico-fisici delle acque;
- 2) errori dietetici qualitativi e quantitativi;
- 3) cause tumorali ed alterazioni genetiche.

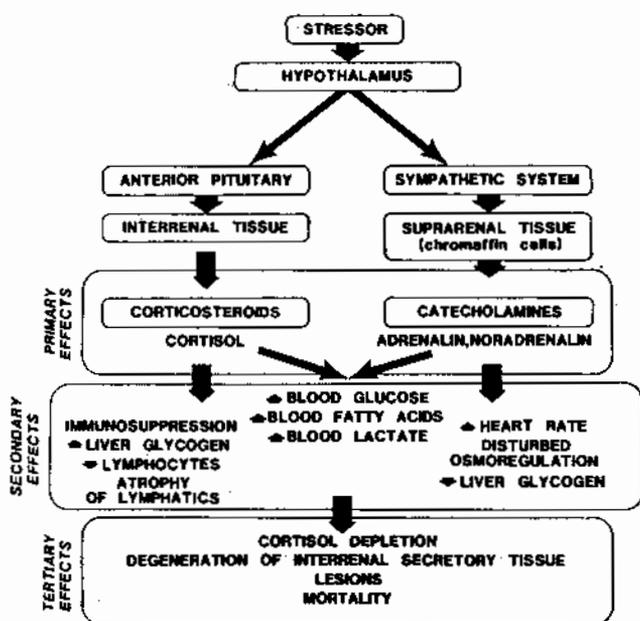


Figura 1 - Risposta del pesce agli agenti stressanti: effetto primario, secondario e terziario. (Sindermann, 1990).

Tratteremo quasi esclusivamente le patologie dovute a variazione dei parametri ambientali con brevi cenni a quelle causate da errori qualitativi/quantitativi della dieta, in quanto l'industria mangimistica oramai è in grado di fornire mangimi idonei ad una buona crescita dei pesci di allevamento. Per le patologie tumorali e di natura genetica, poco frequenti in acquacoltura, si rimanda il lettore ad altre fonti.

### *PATOLOGIE CAUSATE DA FATTORI AMBIENTALI NON IDONEI*

**-Stress sociale-** Lo stress sociale, come già accennato, è dovuto principalmente alla eccessiva densità animale e alla disomogeneità di taglia dei pesci presenti in vasca. I principali segni di stress sociale sono a carico della cute e dei suoi annessi: alterazioni quantitative del muco cutaneo e del colore della pelle, lesioni sulle pinne, perdita di squame ed emorragie generalizzate. La causa è da ricondursi al comportamento altamente gerarchico che si accentua all'interno di una popolazione di pesci che si trova ad una alta densità, in cui il dominante si impone soprattutto nella fase di alimentazione, su tutti gli altri individui.

Particolare manifestazione di stress sociale è il cannibalismo che si verifica soprattutto nei primi stadi di allevamento, per un'eccessiva densità di individui e/o per carenza di alimento. Per migliorare la situazione, è necessario ridurre la densità animale e fornire l'alimento in tutte le ore di luce del giorno. Tra pesci di taglia maggiore il cannibalismo è meno frequente e riconosce come causa predisponente anche la differenza di taglia. Le lesioni conseguenti al cannibalismo si manifestano principalmente a carico della coda e della testa. Non è infrequente osservare, soprattutto in avannotti, il cosiddetto "pesce a due code": il predatore non riuscendo ad ingerire la preda, finisce per morire asfissiato con la preda ancora impegnata in cavità orale.

Il comportamento gerarchico, o meglio, lo stato di stress procurato da esso, influenza quindi la capacità di risposta immunitaria. Pesci dominanti rispondono alla stimolazione antigenica con un titolo anticorpale decisamente superiore a quello dei soggetti dominati.

**-Manipolazioni e traumatismi in generale-** Lesioni traumatiche si verificano spesso in corso di manipolazioni per opere di trasferimento, pesca, selezione, marchiatura e spremitura dei riproduttori nella stagione della fregola. Alcune volte i pesci al di sotto della taglia media rimangono imprigionati durante le opere di selezione nelle maglie della rete. Se non giungono a morte, dopo poche ore dall'evento traumatico sarà possibile osservare

un anello scuro nastriforme (ematoma) attorno all'asse maggiore del corpo alla base agli opercoli; tale ematoma, se la lesione non ha interessato i tessuti profondi esiterà in qualche giorno.

Più gravi possono essere le lesioni a carico della superficie del corpo dovute non solo ai traumatismi arrecati da selezionatori, guadini, reti etc., ma anche a quelli dovuti all'intimo contatto tra pesci che avviene durante l'opera di trasferimento e di selezione. Spesso esitano gravi lesioni al globo oculare che, se complicate da batteriosi secondarie (panoftalmitic -esoftalmo infettivo-), procurano opacamento corneale (cheratite pannosa traumatica) od addirittura avulsione del globo stesso con grave deprezzamento del prodotto nella commercializzazione. Le lesioni traumatiche della cute vengono spesso complicate da agenti batterici o funginei proteolitici che tendono ad ampliare la superficie offesa. Esitano, se avviene la guarigione, lesioni cicatriziali deprezzanti il prodotto finale.

Piccole lesioni cicatriziali puntiformi o di dimensioni poco superiori, possono essere osservate quando l'alimento viene distribuito senza tener conto della taglia dei pesci. A pesci di taglia superiore ai 50-100 grammi l'alimento andrà fornito con mangiatoie in grado di distribuire i pellet in un'ampia superficie; la distribuzione con mangiatoie a nastro infatti può determinare un eccessivo contatto tra pesce e pesce e può essere impiegata solo nei primi mesi di allevamento.

La presenza di predatori ittiofagi può portare a gravi conseguenze non solo per la diffusione di malattie infettive e parassitarie, ma anche per l'immediato effetto negativo sulle produzioni stesse. Un cormorano ad esempio cattura 500-600 grammi di pesce al giorno; nello stomaco di garzette presenti in avannotterie, decedute perchè rimaste intrappolate nelle reti protettive, sono stati rinvenuti anche 300-400 avannotti. Oltre al danno diretto (sottrazione di pesce), spesso i predatori ittiofagi causano ferite al pesce senza riuscire a catturarlo; tali ferite potranno diventare porta di ingresso per batteri patogeni secondari, potenzialmente trasmissibili anche a soggetti sani.

**-Temperatura-** La temperatura è il principale parametro ambientale in grado di influenzare i processi metabolici di animati eterotermi, per cui deve essere tenuto in particolare considerazione.

Temperature relative ad alcune specie oggetto di allevamento

Specie	T° ottimale per la crescita (°C)	T° ottimale per la conversione (°C)
Trota fario	12-14	8-10
Trota iridea	14-16	-
Spigola	20-25	-
Orata	20-25	-
Carpa	25-30	-
Rombo	15	-
Anguilla	20-28	22-26

Ogni specie ittica ha una temperatura ottimale a cui risponde con le migliori performance zootecniche. Al minimo della sua adattabilità termica il pesce riduce la sua attività metabolica, cessa di nutrirsi e cessa quasi del tutto il suo movimento.

La spigola, il cui range termico è compreso tra 21°-23°C, riduce progressivamente l'alimentazione fino a cessare di nutrirsi se la temperatura giunge intorno agli 8°-9°C; al di sotto di tali valori essa rallenta il movimento, la frequenza cardiaca e respiratoria. Infine si adagia sul fondo della vasca reagendo con molta lentezza agli stimoli esogeni.

L'adattamento a variazioni termiche conduce alla sintesi di nuovi isoenzimi adatti ai vari processi metabolici (anabolismo e catabolismo); la morte sopravviene al raggiungimento delle temperature critiche o per variazioni termiche improvvise a causa dell'inattivazione enzimatica e quindi del blocco dei processi metabolici (figura n° 2).

Una particolare attenzione alla temperatura dell'acqua deve essere posta per tutto il ciclo produttivo e non solo nella fase di ingrasso del pesce. Temperature errate determinano una parziale o totale mancanza di maturazione delle gonadi nei riproduttori. Variazioni repentine di temperatura, anche solo di qualche grado, determinano intense mortalità nelle larve.

Alcune malformazioni fisiche, come l'alterazione della mandibola e della colonna vertebrale, possono essere ricondotte in alcuni casi a temperature non idonee durante gli stadi larvali.

La risposta immunitaria è decisamente influenzata dalla temperatura ambientale. La carpa, ad esempio, se allevata a 25°C risponde alla stimolazione antigenica con un buon titolo anticorpale; manca completamente di risposta se allevata a 12°C. Similmente, la trota produce anticorpi a temperature non inferiori a 5°C.

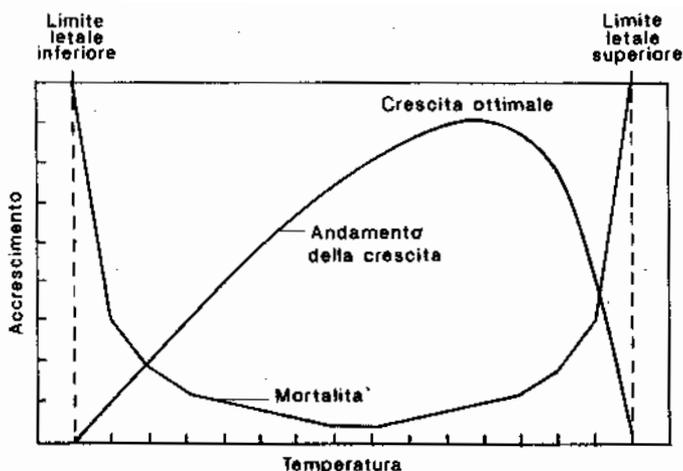


Figura 2 - Relazione tra temperatura ed accrescimento dei pesci di allevamento. (Saroglia & Ingle, 1992).

**-Salinità-** L'ambiente in cui il pesce vive, l'acqua, sia essa dolce o salata, non è mai in equilibrio osmotico con i liquidi cellulari e circolanti. La pressione osmotica dell'acqua è determinata dalla concentrazione dei sali disciolti ed influenza le capacità vitali dell'animale acquatico.

Il pesce d'acqua dolce si trova in ambiente ipo-osmotico in cui l'acqua si diffonde attraverso i tessuti dall'esterno verso l'interno. Il meccanismo fisiologico compensativo è determinato da una efficiente filtrazione renale con eliminazione di urina ipotonica.

Il pesce di acqua salata si trova invece in ambiente iper-osmotico in cui, senza meccanismo fisiologico di compensazione, si assisterebbe alla disidratazione dei tessuti animali. I pesci d'acqua salata si approvvigionano di acqua principalmente dall'alimento, ma anche bevendo l'acqua ambientale. L'eccesso di cloruri, sodio e potassio, viene eliminato da cellule escrettrici dette "cellule a cloruri" presenti a livello branchiale e che ricordano per la loro funzione le "ghiandole del sale" degli uccelli marini. Inoltre, per contrastare l'eccessiva perdita di liquidi attraverso la via urinaria, viene ridotta anche la filtrazione renale; in alcuni casi addirittura alcuni nefroni risultano sprovvisti di glomerulo e la filtrazione è affidata solamente alla porzione tubulare.

I pesci eurialini, nel corso della maggior parte della loro vita, i pesci anadromi (es. salmone) ed i catadromi (es. anguilla), dopo il raggiungimento di un certo stadio vitale, presentano adattabilità a variazioni di salinità anche estremamente ampie. Uno dei pesci eurialini più interessanti per la pratica

acquacolturale, la spigola, vive allo stato selvatico preferenzialmente alle foci dei fiumi, in acque salmastre, ma può essere rinvenuta sia in acque dolci che in acque a salinità molto elevate (50-70 %). La spigola, pur presentando un ampio range vitale, fornisce le migliori prestazioni zootecniche in acqua a salinità comprese tra 15% e 25%. Al di sopra ed al di sotto di questo intervallo, l'animale "consuma" parte dell'energia fornita con l'alimento per l'adattamento all'equilibrio osmotico.

Il meccanismo di regolazione osmotica è garantito da un complicato meccanismo ormonale che coinvolge l'ipofisi posteriore ed il rene. Nei pesci eurialini si riscontrano notevoli mortalità se la variazione salina è brusca ed ampia. Nessun problema intercorre ove la variazione avvenga gradualmente.

Ricordiamo in conclusione che l'allevamento dei pesci eurialini in acqua dolce risulta tecnicamente possibile anche se gli animali forniscono ridotti accrescimenti, diminuzione dell'indice di conversione e facile insorgenza di patologie. Inoltre il prodotto finito risulta qualitativamente meno pregiato, non presentando il caratteristico odore "di alghe" tipico del pesce di mare.

**-Gas disciolti-** Il tasso di *ossigeno disciolto* (DO), tra i principali fattori limitanti delle produzioni in acquacoltura, viene influenzato dalla temperatura ambientale e dalla salinità (figura n° 3). Per poter aumentare le produzioni intensificando la densità animale, si impone all'operatore l'esigenza di ossigenare l'acqua o con aereatori meccanici con i quali si possono ottenere concentrazioni di ossigeno disciolto mai superiori ai valori di saturazione, o con l'impiego di ossigeno puro, con cui si possono ottenere concentrazioni ben al di sopra della saturazione. Il consumo di ossigeno non è solo da addebitarsi alla biomassa allevata, ma anche all'attività metabolica di altri organismi autotrofi ed eterotrofi presenti in vasca ed ai processi di ossidazione delle sostanze organiche. Se ne deduce che la sanità dell'allevamento è garantita quindi dall'ottimizzazione dell'ossigenazione; anche sul fondo della vasca, punto di raccolta di feci e di mangime non utilizzato, bisognerà impedire la formazione di "sacche" di anossia, con produzione di sostanze altamente tossiche anche a bassissime concentrazioni (ad es.  $H_2S$ ). Inoltre il contatto con l'aria atmosferica che permette l'insufflazione della vescica natatoria, può venire a mancare a causa del film lipidico che gradualmente si forma sulla superficie delle vasche di allevamento larvale (attorno a 150 gradi/ giorno per la spigola).

Di importanza nel determinare la sopravvivenza degli animali l'ossigeno disciolto influenza l'attività metabolica e la conversione alimentare del pesce

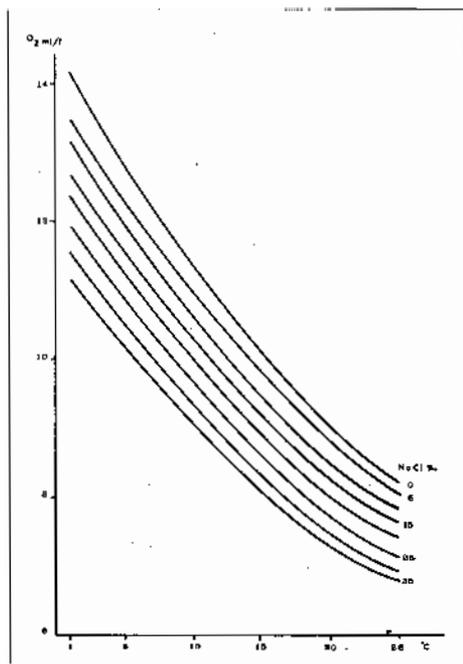


Figura 3 - Ossigeno disciolto (DO): tasso di saturazione al variare della temperatura e della salinità. (Bamabé, 1989).

allevato. Nelle specie eurialine ad esempio, valori di DO superiori a 5 mg/l sembrano essere ottimali se garantite per tutto l'arco delle 24 ore, per il raggiungimento del miglior indice di conversione. Al di sotto di 5 mg/l la conversione alimentare peggiora con spreco relativo di mangime. Se la concentrazione di DO scende sotto a 3 mg/l, il pesce rallenta l'attività natatoria, diminuendo al contempo l'attività di ricerca del cibo. Quando vengono raggiunti tassi di 2 mg/l, il pesce arresta completamente l'attività natatoria, si appoggia con il ventre sul fondo della vasca e mostra evidenti segni di stress. L'anossia, anche se di breve durata, determina le reazioni "a cascata" di risposta agli agenti stressanti. Studi condotti su alcune specie ittiche, hanno dimo-

strato come i valori plasmatici di corticosteroidi siano ancora alterati dopo alcuni giorni in pesci sottoposti ad anossia.

Gli effetti negativi dovuti alla parziale carenza di DO nell'acqua si riflettono anche sulle uova embrionate: maggiore fragilità, diminuzione della percentuale di schiusa, schiusa di larve affette da malformazioni fisiche e alterazioni metaboliche.

La *ipersaturazione di gas totali* determina una grave patologia nota come "malattia da gas" (gas-bubble disease) (Foto 1). Essa è di comune riscontro nelle aziende che si alimentano con acqua di pozzo, spesso ricche in azoto ed in anidride carbonica. Anche variazioni repentine di temperatura (comuni in acquariologia), l'ossigenazione in profondità con aria atmosferica, l'eccessiva proliferazione algale e l'alimentazione con acqua proveniente da bacini artificiali sono comuni evenienze in grado di determinare sovrasaturazione. Per ovviare al fenomeno, si rende necessario far correre l'acqua ipersatura in condotte provviste di degassatori affinché perda i gas in eccesso ed assicurarsi, benchè vi siano differenze per specie e per età, che la percentuale di

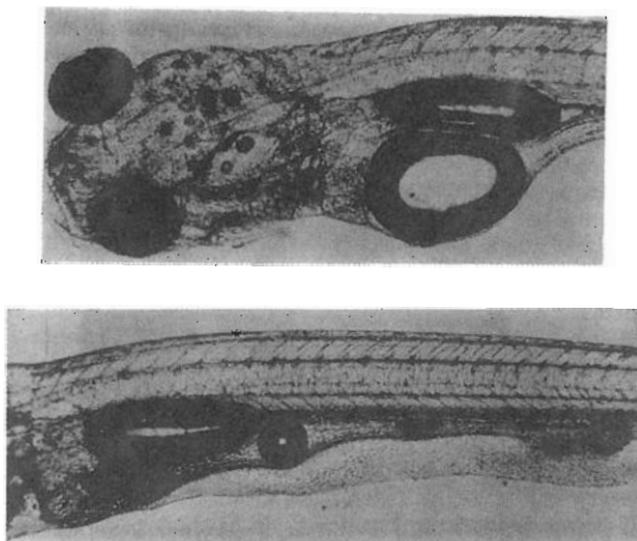


Foto 1 - Malattia da bolla gassosa in avannotti di carpa (da Schaperklauss,1992)

gas totali non sia superiore a 105-110%. L'uso di ossigeno puro determina condizione di sovrasaturazione relativa e non totale, poichè il gas immesso "strippa" e quindi elimina gli altri gas disciolti (principalmente  $N_2$  e  $CO_2$ ).

La patogenesi della malattia da gas risulta simile a quella dell'embolia gassosa del subacqueo. Clinicamente si distinguono due forme, una acuta con morte repentina per embolia gassosa generalizzata, ed una cronica, detta esantematica, in cui il pesce presenta a carico di tutte le superfici esterne e soprattutto a livello oculare, opercolare e tra i raggi delle pinne, piccole bollicine di gas. L'occhio appare esoftalmico (esoftalmo gassoso), può presentare opacamento della cornea ed opacamento e prolasso del cristallino; in casi estremi si può avere l'avulsione del globo oculare. Le branchie, spesso interessate, presentano vasi ematici dilatati (aneurisma gassoso) il cui lume viene ad essere occupato da gas. Spesso il pesce muore in atteggiamento asfittico per degenerazione dell'epitelio branchiale e perdita funzionale del tessuto. Anche il sistema nervoso centrale ed organi e visceri celomatici possono presentare tali lesioni esantematiche.

L'eccesso di *anidride carbonica* ( $CO_2$ ) nell'acqua determina seri problemi al pesce di allevamento: diminuzione dell'appetito, della crescita e dell'indi-

ce di conversione con facile insorgenza di patologie secondarie. La tolleranza alle alte concentrazioni di  $\text{CO}_2$  è notevolmente influenzata dal pH del mezzo. In ambiente neutro, infatti il pesce può tollerare concentrazioni di  $\text{CO}_2$  di gran lunga superiori a quelle tollerabili in ambiente acido (pH 5,5-6).

Nella trota è conosciuta una patologia, nota come Nefrocalcosi, determinata da concentrazione di  $\text{CO}_2$  superiore a 12 mg/l in presenza di fattori concomitanti come la dieta artificiale ed un suo squilibrio in sali minerali, anche se alcuni autori hanno riprodotto la malattia alimentando gli animali con bassi livelli di sali. Il quadro anatomo-patologico consiste nella precipitazione di sali di calcio (fosfati) a livello dei tubuli renali con estese calcificazioni dell'organo stesso che portano nei casi più gravi alla perdita funzionale. La sintomatologia non presenta segni patognomonic; compare di solito anoressia, abulia, esoftalmo, rigonfiamento addominale e segni generali di stress. Con l'eliminazione della causa scompare anche il quadro sintomatologico. Spesso infatti sono le acque di sorgiva ad essere particolarmente ricche di  $\text{CO}_2$  ma il loro trattamento preventivo con degassatori riduce l'eccesso di gas nelle acque eliminandone la pericolosità.

Non solo l'eccesso ma anche la deficienza di  $\text{CO}_2$  può alterare l'omeostasi dei pesci di allevamento. Acque reflue da impianti termici utilizzate a scopo acquacolturale, in cui la concentrazione di  $\text{CO}_2$  può essere inferiore a 1 mg/l determinano nella carpa alcalosi respiratoria per effetto di iperventilazione branchiale. Se l'insulto ambientale persiste, segue l'esaurimento del sistema tampone (equilibrio acido-basico) che sfocia nell'alcalosi metabolica.

**-Cataboliti azotati-** Anche l'esposizione ai cataboliti azotati può determinare nei pesci gravi alterazioni dell'omeostasi. Nei pesci il principale composto d'escrezione azotato, oltre all'urea ed all'ossido di trimetilamina, è l'*ammoniaca* (animali ammoniotelici) che in acqua si dissocia in ione ammonio ( $\text{NH}_4^+$ ), in percentuale differente in dipendenza della temperatura e del pH del mezzo, secondo il seguente algoritmo:

$$\% \text{NH}_3 = 100 / 1 + 10^{(10,068 - 0,033 * T^\circ - \text{pH})} \quad \text{NH}_4^+ + \text{OH}^- \leftrightarrow \text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O}$$

Solamente la percentuale di ammoniaca non dissociata risulta tossica per il pesce e la sua concentrazione in acqua non deve superare valori di 0,07-0,1 mg/l a seconda della specie. L'intossicazione da ammoniaca può essere relativa od assoluta (figura n° 4). L'intossicazione relativa è dovuta ad un processo di autointossicazione; in presenza di pH elevati viene inibita la dif-

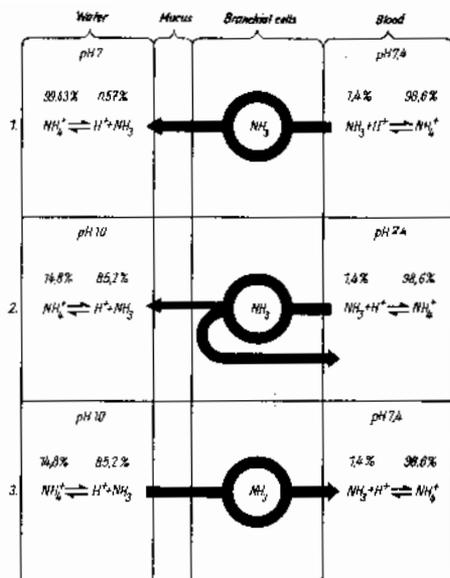


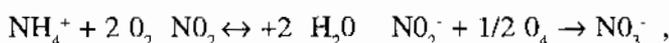
Figura 4 - Diffusione dell'ammoniaca attraverso apparato branchiale in funzione del pH: 1-diffusione normale dal sangue all'acqua; 2- Intossicazione relativa; 3- intossicazione assoluta. (Schaperclaus, 1992).

ne geologica del terreno a determinare valori di pH elevati, l'intossicazione assoluta dipende invece esclusivamente della concentrazione in acqua di ammoniaca indissociata.

Gli effetti dell'intossicazione coinvolgono principalmente le superfici esposte (branchie, cute ed annessi cutanei) ed il sistema nervoso; anche gli organi cavitari e più in generale altri tessuti possono presentare segni di alterazioni degenerative. Le branchie appaiono ipermucose, edematose ed iperplastiche; in caso di esposizione cronica al tossico il danno diviene prevalentemente degenerativo con estese necrosi delle lamelle secondarie su un quadro generale emorragico. Stesse alterazioni possono comparire a carico della cute e soprattutto delle pinne. In caso di intossicazione cronica, compaiono segni di alterazione nervosa: contrazioni spastiche muscolari ed atassia locomotoria. Il danno istologico, procurato soprattutto a livello branchiale, determina facile insorgenza di patologie batteriche di irruzione secondaria (principalmente Myxobatteri) che aggravano ulteriormente la patologia e portano al quadro noto come "Malattia branchiale".

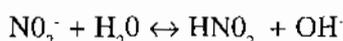
L'ossidazione dei composti ammoniacali porta a composti chimici derivati (nitriti e nitrati) secondo le seguenti reazioni:

fusione dell'ammoniaca dal sangue all'ambiente esterno anche in assenza di una elevata concentrazione di ammoniaca in acqua (Foto 2). Quando invece la concentrazione di ammoniaca indissociata supera la soglia di rischio di 0,07-0,1 mg/l, si potrà verificare una diffusione retrograda di catabolita tossico (intossicazione assoluta). Mentre l'eventualità dell'intossicazione relativa rappresenta un pericolo costante in acque a pH particolarmente elevato; tipico esempio sono alcune carpicoltive dell'Europa orientale, ove è la costituzione



da cui si desume come la prima reazione, da ammonio a nitrito, sia un processo reversibile in assenza di ossigeno nel mezzo.

Mentre i nitrati risultano tossici solamente ad alte concentrazioni, lo ione nitrito in acqua si dissocia in acido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ) secondo la reazione:



in percentuale variabile a seconda della temperatura, del pH e della durezza dell'acqua. La concentrazione dell'acido nitroso non deve essere mai superiore in troficoltura a 0,0002 mg/l.

Gli effetti tossici dell'avvelenamento da nitriti, più comuni nelle acque dolci che nelle acque salate ove la presenza di ioni  $\text{Cl}^-$  e diminuisce la tossicità, sono riconducibili alla trasformazione dell'emoglobina in metalemmoglobina, quindi con alterazione funzionale del gruppo eme che provoca uno stato di ipossigenazione tessutale. Clinicamente l'intossicazione da acido nitroso si manifesta con dispnea e cianosi dell'apparato branchiale. In caso di avvelenamento, l'unico trattamento terapeutico risulta essere a base di blu di metilene somministrato per via idrica, in grado di aumentare e perciò favorire il consumo cellulare di ossigeno. Nella pratica si consiglia di non superare le concentrazioni di 0,1 mg/l in acqua dolce e di 1 mg/l in acqua salata.

### *PATOLOGIE CAUSATE DA ERRORI ALIMENTARI*

Al giorno d'oggi le malattie causate da errori alimentari sono sempre più rare per lo sviluppo nel corso degli ultimi anni di studi sui fabbisogni alimentari quanti/qualitativi delle specie oggetto d'allevamento.

Tuttavia alcune volte possono insorgere alcune patologie causate soprattutto da cattiva conservazione dei mangimi o loro somministrazione oltre la data di scadenza; per cattiva conservazione dei mangimi le vitamine ad esempio, vanno incontro ad un processo di degradazione; i lipidi, se esposti ad umidità elevata, al sole diretto, etc., possono andare in contro ad un processo d'ossidazione (irrancidimento) e determinare nel pesce degenerazione ceroidale del fegato, con perdita funzionale dell'organo che appare di color giallo-ocra, megalico e facilmente friabile, mentre in cavità celomatica si ha la presenza di trasudato bianco-giallastro (ascite).

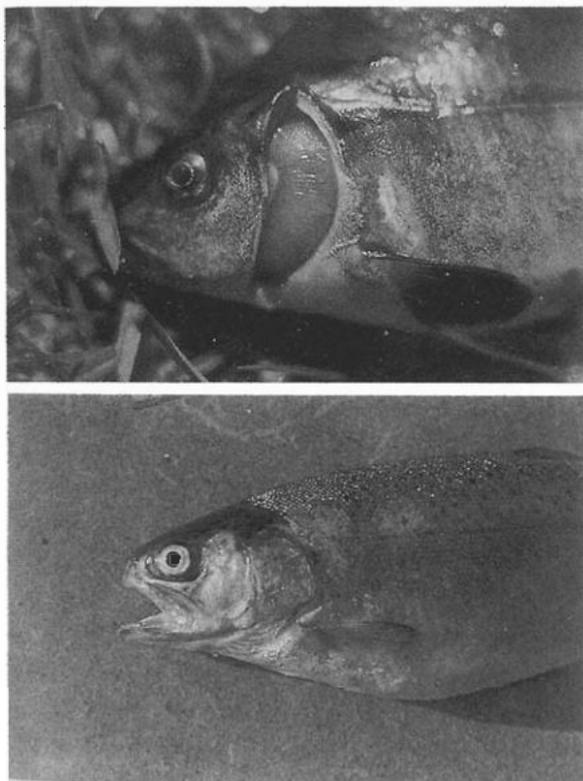


Foto 2 - Iperemia ed emorragia dovuta ad autointossicazione da  $\text{NH}_3$ , conseguenza di un aumentato valore di pH. (Da Schaperklauss, 1992)

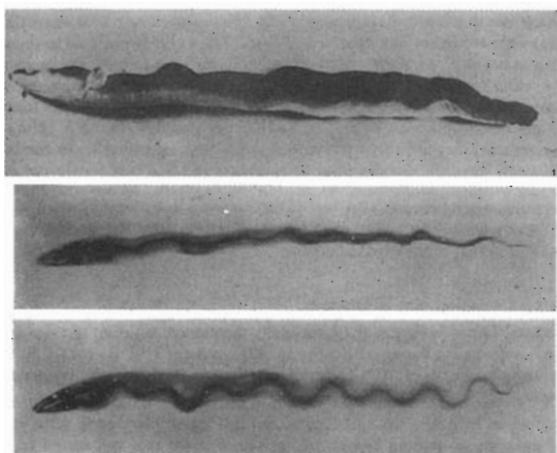


Foto 3 - Plecospondilite in anguilla (curvatura d'onda) dovuta a deficienza di vitamina D. (Da Schaperklauss, 1992)



Foto 4 - Malformazione dell'opercolo in carpa cuoio di 4 settimane di età dovuta a a probabile deficienza di vitamina D. (Da Schaperklauss, 1992)

Di seguito, per brevità, riportiamo schematicamente, le vitamine principali per il fabbisogno dei pesci allevati e i segni di carenza vitaminica (Foto 3-4). Particolare importanza riveste la vitamina C, implicata in molti processi fisiologici come la sintesi di collagene, la produzione delle emazie, non ultimo la capacità di risposta allo stress. Questa vitamina inoltre ha dimostrato capacità difensive nei confronti di inquinanti di natura organica (nitriti) ed inorganica (metalli pesanti). Una sua carenza porta anche all'alterazione dell'integrità dell'intima dei vasi sanguigni in particolar modo a livello capillare.

*Vitamina A:* diminuzione della crescita, anoressia, anemia, emorragie delle superfici esterne (branchie, cute ed annessi cutanei), mortalità.

*Vitamina E:* degenerazione del fegato, diminuzione della crescita, anemia, mortalità.

*Vitamina B<sub>1</sub>:* anoressia, alterazione dell'indice di conversione, atassia locomotoria, anemia, atrofia muscolare, iperpigmentazione, esoftalmo, mortalità.

*Vitamina B<sub>2</sub>:* anoressia, emorragie oculari e sulle superfici esposte, intorbidamento del cristallino, diminuzione della crescita, necrosi branchiale, mortalità.

*Vitamina B<sub>6</sub>*: anoressia, diminuzione della crescita, contrazioni tonico-cloniche della muscolatura, esoftalmo, mortalità.

*Acido pantotenico*: anoressia, iperemia ed alterazioni branchiali degenerazione del fegato, atassia locomotoria, esoftalmo anemia, mortalità.

*Nicotinamide*: anoressia, diminuzione della crescita, edema dell'epitelio branchiale, anemia, emorragie cutanee, mortalità.

*Acido folico*: diminuzione della crescita, anemia macrocitica, atassia locomotoria, aumento dell'indice epato-somatico, alterazione della pinna caudale, mortalità.

*Vitamina C*: diminuzione della crescita, alterazione dell'indice di conversione, alterazione della colonna vertebrale, dell'opercolo e dell'arco cartilagineo branchiale, emorragie cutanee e tessutali, mortalità.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Barnabé G., *Aquaculture. Technique et Documentation*, Lavoisier (1989).
- 2) Brown L., *Aquaculture for Veterinarians. Fish Husbandry and Medicine*, Pergamon Press.
- 37) Ghittino P., *Tecnologia e Patologia in Acquacoltura*, Vol. 2 Patologia. Tipografia Emilio Bono, Torino (1985).
- 4) Roberts R.J., *Patologia dei Pesci*, Ed. Italiana a cura di G. Giorgetti. Edizioni Edagricole (1990).
- 5) Saroglia M. & Ingle E., *Tecniche di Acquacoltura*, Edagricole (1992).
- 6) Schäperclaus W., *Fish Diseases*, Vol. 2. A.A. Balkema/Rotterdam (1992).
- 7) Sindermann C.J., *Principal Diseases of Marine Fish and Shellfish*, Vol. 1; 2nd edition. Academic Press, Inc. (1990).

# LA PATOLOGIA DIFFUSIVA NELL'ALLEVAMENTO ITTICO

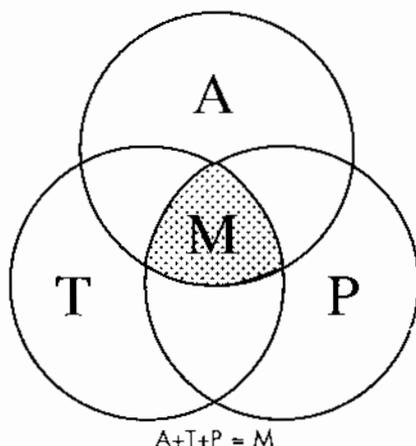
GIORGETTI C.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie  
Dipartimento di Ittiopatologia. Basaldella (UD)*

I pesci, allevati e non, soffrono delle stesse patologie che colpiscono gli animali omeotermi, cioè dotati di temperatura propria del corpo. Poichè i pesci invece assumono la temperatura dall'ambiente che li circonda, quest'ultimo ha un'importanza fondamentale nella insorgenza e nelle evoluzioni delle varie forme patologiche. In acquacoltura quasi mai l'agente eziologico patogeno causa la malattia, ma è necessaria l'interazione di agente patogeno più ospite in una certa situazione ambientale per causare la malattia. Uno dei grafici classici, che riportano ormai tutti i testi di Ittiopatologia, è quello dei cerchi proposto per primo dallo Sniesko negli anni '60, e poi riportato dagli altri Autori. Qui di seguito Ve lo riproponiamo:

Interazione di fattori necessari allo sviluppo di malattie in trotacoltura.

T+P NON VUOL DIRE MALATTIA, MENTRE  
T+P IN UN "CERTO" AMBIENTE PUO' VOLER DIRE MALATTIA



A = AMBIENTE  
T = TROTA  
P = PATOGENO  
M = MALATTIA

Mentre l'importanza dell'ospite e dell'agente patogeno aumenta in modo geometrico, oltre certi parametri, l'importanza dell'ambiente aumenta in modo esponenziale.

In questa patologia condizionata, l'uomo agisce sempre come primo attore negli allevamenti; nell'ambiente esterno le cause naturali che condizionano le patologie non sono immediatamente riferibili all'uomo, che può però aver creato i presupposti per una situazione sfavorevole a monte, con una gestione negativa del territorio. In mari chiusi, ad esempio come il Mediterraneo, possono insorgere alterazioni eutrofiche che portano all'inalgamento, carenze di ossigeno, presenza eccessiva di ammoniaca e altro.

Negli allevamenti, invece, l'uomo agisce direttamente e immediatamente sullo sviluppo delle patologie, con le tecniche di gestione. Tanto più queste sono spinte, tanto più il pesce è sovraffollato, ipernutrito, selezionato, e quindi stressato, tanto più sarà vittima di patologie.

In questi casi l'allevatore sceglie lui stesso l'incidenza della patologia con la determinazione di un equilibrio tra la necessità di allevare intensivamente ed il tributo sanitario che queste tecniche richiedono.

Tutto fa prevedere comunque che le esigenze sempre maggiori di prodotti di qualità convinceranno gli allevatori a produrre senza "spingere" troppo secondo criteri più vicini possibile a quelli naturali.

"Sano come un pesce" poteva essere un detto senz'altro vero considerando un pesce solo in mezzo ad un mare pulito; lo stesso detto non è certamente assimilabile ad un gruppo di animali costretto in spazi limitati sotto il completo controllo dell'uomo che ha come primario interesse la crescita più rapida possibile.

Riterrei opportuno ora, proporVi i risultati diagnostici del nostro Laboratorio nel 1994.

Essi corrispondono ai campioni qui repertati, per la maggior parte da privati ma anche da enti pubblici, da un territorio di giurisdizione che produce da solo i due terzi della produzione ittica nazionale.

Il campione appare quindi significativo dell'intera realtà italiana.

Campioni reperati nel 1994 ed esaminati dal laboratorio di Ittiopatologia, dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, centro di referenza nazionale per le malattie dei pesci. (D.M. 31.10.1994)

#### ACQUA DOLCE - PESCI

specie	n° campioni	n° soggetti	n° esami autoptici	n° esami microscopici	n° esami colturali	n° esami virologici	n° esami istologici	n° antibiogrammi
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	700	5.108	125	121	495	475	1	684
<i>Salmo trutta fario</i>	62	857	20	16	39	46	0	0
<i>Salmo trutta marmoratus</i>	44	375	12	12	42	9	0	0
<i>Anguilla anguilla</i>	18	68	9	10	11	7	1	0
<i>Ictalurus melas</i>	12	37	2	2	9	10	0	0
<i>Ictalurus punctatus</i>	10	45	2	2	3	9	0	0
Altri pesci	101	343	69	71	60	31	0	24
TOTALE	947	6.833	239	234	659	785	2	708

Fra tutte le patologie considerate si conferma che la stragrande maggioranza appartiene al gruppo delle patologie condizionate da fattori ambientali e gestionali.

Casi non riferibili a questi ultimi recentemente possono essere le Pasteurellosi in mare aperto, particolarmente quando la patologia è appena arrivata nel Mediterraneo.

In quel periodo, nel 1991, i pesci colpiti non avevano alcuna memoria immunitaria rispetto alla *Pasteurella piscida* che colpiva così animali completamente recettivi. Ci sono state ingenti mortalità di cefali in mare, e mortalità vicine al 100% negli allevamenti di giovani spigole ed orate. La situazione comunque si è già andata modificando verso una minore patogenità della Pseudotubercolosi. Ci sembra opportuno ora ricordare brevemente le ultime normative comunitarie concernenti lo scambio di pesci vivi tra i Paesi della Comunità e da o per i Paesi Terzi.

PATOLOGIE RISCOstrate

Agente eziologico	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>S. trutta lario</i>	<i>S. trutta marmoratus</i>	<i>A. anguilla</i>	<i>I. melas</i>	<i>I. punctatus</i>	Altri pesci
Ambiente	5	0	0	0	0	0	2
M. branchiale	27	2	1	1	1	0	18
Malattia da gas	5	0	0	0	0	0	1
Micosi	1	1	0	0	1	0	2
Acantocefalosi	1	0	0	0	0	0	1
Anguillicolosi	0	0	0	2	0	0	0
Chilodoniasi	0	0	0	0	0	0	4
Costiasi	1	1	0	0	0	0	1
Dattilogirosi	0	0	0	5	0	0	6
Girodattilosi	11	2	3	0	0	0	1
Henneguiosi	0	0	0	0	0	1	0
Hexamitiasi	0	1	0	0	0	0	1
Ictiofiriasi	11	1	0	0	0	0	5
Metacercarie	0	0	0	0	0	0	2
Myxidiosi	0	0	0	3	0	0	0
Nematodi	0	0	0	0	0	0	4
Oodiniasi	0	0	0	0	0	0	1
Trematodi	1	0	0	0	0	0	3
Trichodiniasi	0	0	0	3	0	1	1
PKD	6	0	0	0	0	0	0
<i>Aeromonas</i> spp.	4	0	0	0	0	0	2
<i>A. hydrophila</i>	19	2	3	0	1	0	10
<i>A. salmonicida</i>	7	8	0	0	0	0	2
BKD	0	0	21	0	0	0	3
<i>C. freundii</i>	5	0	0	0	0	0	0
Cocchi	5	2	0	0	0	0	0
Diplococchi	0	0	0	0	0	0	1
Enterobatteri	3	3	0	0	0	0	3
Myxobatteri	5	2	0	0	0	0	0
<i>Pseudomonas</i> spp.	2	0	1	0	0	0	1
Stafilococchi	0	0	0	0	0	0	1
Streptococcosi	6	0	0	0	0	0	0
<i>Vibrio</i> spp.	1	0	0	0	0	0	0
<i>V. anguillarum</i>	19	0	0	0	0	0	0
<i>Y. ruckeri</i>	146	0	0	0	0	0	1
Herpesvirus	0	0	0	0	1	4	0
NEI	38	0	0	0	0	0	0
NPI	36	2	0	0	0	0	0
SEV	21	1	0	0	0	0	0
Viremia Carpa	0	0	0	0	0	0	2

Legenda: PKD: Proliferative kidney disease  
 BKD: Bacterial kidney disease  
 NEI: Necrosi ematopoietica infettiva  
 NPI: Necrosi pancreatica infettiva  
 SEV: Settlicemia emorragica virale

## ACQUA MARINA - PESCI

specie	n° campioni	n° soggetti	n° esami autopfici	n° esami microscopici	n° esami colturali	n° esami virologici	n° esami istologici	n° antibiogrammi
<i>Dicentrarchus labrax</i>	119	380	119	56	118	5	1	0
<i>Sparus aurata</i>	195	777	195	60	157	46	5	0
Altri pesci	102	784	102	90	101	3	0	72
TOTALE	416	1.941	416	206	376	54	6	72

## PATOLOGIE RISCOSE

Agente eziologico	<i>D. labrax</i>	<i>S. aurata</i>	Altri pesci
Malattia branchiale	13	6	1
Malattia da gas	0	1	2
Argulosi	0	0	1
Dattilogirosi	7	1	1
Diplectanosi	18	0	1
Epiteliocisti	0	2	0
Ergasilosi	0	1	0
Girodattilosi	2	0	13
Ictioftiriasi	0	0	1
Metacercarie	0	0	16
Myxidiosi	0	0	1
Myxosporidiosi	0	0	8
Oodiniasi	4	1	3
Scifidiosi	0	0	2
Trematodi	0	2	1
Trichodiniasi	16	13	8
<i>Aeromonas</i> spp.	1	6	4
<i>A. hydrophila</i>	0	0	2
<i>A. salmonicida</i>	0	1	0
Cocchi	0	0	2
Diplococchi	0	0	1
Myxobatteri	1	2	0
<i>Pasteurella piscicida</i>	34	4	2
<i>Pseudomonas</i> spp.	0	7	1
<i>Vibrio</i> spp.	11	14	10
<i>V. alginolyticus</i>	1	0	18
<i>V. anguillarum</i>	12	6	1
<i>V. parahaemolyticus</i>	1	1	3
<i>V. vulnificus</i>	0	0	1
Linfocisti	0	3	0
Parvovirus	0	4	0
Picornavirus	1	3	0

## ACQUA MARINA - MOLLUSCHI

specie	n° campioni	n° soggetti	n°esami autoptici	n°esami microscopici	n°esami culturali	n°esami virologici	n°esami istologici
<i>Ruditapes philippinarum</i>	34	1.690	34	34	7	0	34
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	9	450	8	8	0	0	8
<i>Modiolus barbatus</i>	1	33	0	1	0	0	1
<i>Chamaelea gallina</i>	1	50	1	1	1	1	1
TOTALE	45	2.223	43	44	8	1	44

## PATOLOGIE RISCOSE

agente eziologico	<i>R.philippinarum</i>	<i>M.galloprovincialis</i>	<i>M.barbatus</i>	<i>C.gallina</i>
<i>Marteilia</i> sp.	0	1	0	0
<i>Perkinsus</i> sp.	14	0	0	0
<i>Pseudomonas</i> spp.	1	0	0	0
<i>Vibrio</i> spp.	3	0	0	0
<i>Vibrio tubiashii</i>	1	0	0	0

Questo settore viene normato dalla Direttiva 91/67 CEE del 28 gennaio 1991 recepita con D.P.R. n. 555 del 30 dicembre 1992; preme soprattutto sottolineare i principi su cui si basa questa Direttiva, che sono essenzialmente due:

1. La situazione sanitaria è diversa nei vari Paesi della Comunità;
2. Il passaggio di pesci vivi, con situazioni sanitarie diverse nei Paesi Comunitarie terzi, può diffondere malattie e quindi provocare danno economico alla Comunità.

Come funziona la Direttiva?

L'Europa, senza confini, per proteggersi, delimita delle aree sanitarie in rapporto alla situazione sanitaria ed alle specie presenti in un determinato territorio. Lo scambio di pesce vivo è consentito così tra zone con la medesima situazione sanitaria, oppure tra zone con una situazione sanitaria mi-

gliore verso zone con situazione sanitaria peggiore.

Così chi avrà la situazione sanitaria migliore potrà esportare verso tutte le aree comunitarie, chi avrà invece alcune malattie, contemplate nella Direttiva, potrà esportare solo verso aree in cui saranno presenti queste malattie.

La patologia quindi non condizionerà più l'allevamento per maggiori mortalità, problemi di gestione, mancato rispetto dei contratti ed altro, ma condizionerà anche l'allevamento commercialmente.

Senza riportare una ulteriore tabella, vogliamo solo ricordare che le malattie contemplate in Direttiva e che più da vicino riguardano i nostri allevatori sono la Setticiemia Emorragica Virale e la Necrosi Ematopoietica Infettiva per i pesci, e la Bonamiasi e la Marteiliosi per i molluschi.

#### *COSA POSSIAMO FARE PER LIMITARE I DANNI CAUSATI DALLA PATOLOGIA:*

1. Modificare le tecniche di ALLEVAMENTO troppo spinto; ridurre quindi quelle situazioni stressorie che predispongono i pesci alle patologie, e andare anche incontro alle esigenze qualitative del mercato.

2. Intervenire sulla GENETICA per la produzione di specie meno sensibili alle malattie.

3. Sviluppare il campo della IMMUNOPROFILASSI.

Esistono oggi dei vaccini perfettamente funzionanti, tipo quello della Bocca Rossa e della Vibriosi. Bisogna trovare nuovi vaccini e nuovi metodi per la somministrazione del vaccino, che oggi vengono tutti utilizzati per immersione, creando una grave situazione di stress nei pesci trattati.

4. Bisogna aggiornare i presidi TERAPEUTICI da utilizzare in Acquacoltura.

Oggi gli antibiotici concessi sono estremamente pochi e lasciano vistose lacune, per quanto riguarda la sensibilità, ad una notevole parte della patologia batterica.

# IL SISTEMA IMMUNITARIO DEI TELEOSTEI

GALEOTTI M.

*Dipartimento di Scienze della Produzione Animale, Udine*

## IMMUNITA' ASPECIFICA

### 1. BARRIERE SUPERFICIALI

#### 1.1 Muco

Il muco ricopre in modo continuo la cute, le branchie e l'intestino, costituendo una barriera che inibisce la colonizzazione del tegumento da parte dei microrganismi. La produzione di muco risulta accentuata in seguito all'instaurarsi di un processo flogistico o ad un semplice fenomeno irritativo di tipo chimico-fisico. La funzione più importante del muco è quella di protezione dell'interno dell'organismo dall'invasione da parte di batteri e funghi o dalla penetrazione di particelle o altro materiale estraneo sospeso nell'acqua.

Fino ad ora le informazioni relative al muco dei pesci erano scarse e spesso trasferite per analogia da quello dei mammiferi. Attualmente è noto che il muco contiene enzimi come la tripsina, il lisozima e anticorpi agglutinanti.

#### 1.2 Cute

La cute dei teleostei è costituita, partendo dall'esterno, dall'epidermide, dal derma e dall'ipoderma. Annessi alla cute esistono organi accessori come recettori sensoriali, squame, ghiandole mucose e organi luminescenti. L'epidermide a sua volta è costituita da due strati: uno più superficiale, di tipo stratificato, e uno più profondo, lo strato delle cellule basali o delle cellule germinali, che è composto da cellule indifferenziate.

Le cellule mucose, presenti su tutto il corpo, si originano negli strati intermedi dell'epidermide e successivamente raggiungono gradualmente la superficie della cute, aumentando di dimensioni. La loro secrezione contiene principalmente glicoproteine.

Nelle forme larvali di alcuni pesci e fino allo stadio di avannotto è stata osservata la presenza di una discreta quantità di tripsina (fig. 1) e di lisozima (fig. 2) a livello dell'epidermide. Questi enzimi rivestirebbero notevole importanza soprattutto nei primi stadi di vita del pesce, quando ancora altri tipi

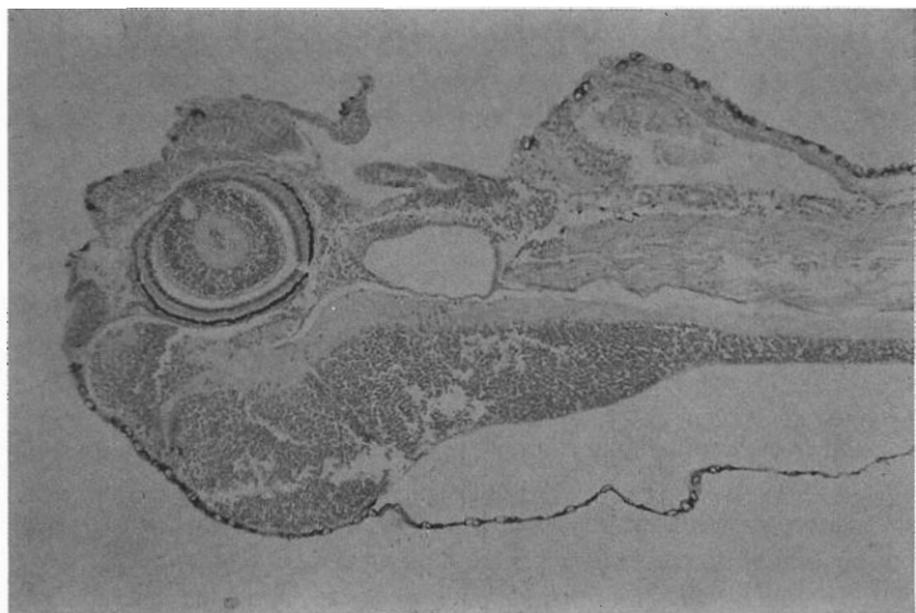


Fig. 1 - Larva di branzino (*Dicentrarchus labrax*), Evidenziazione immunistoichimica di tripsina a livello della cute. ABC e diaminobenzidina, contrastata con Ematossilina. 10X.

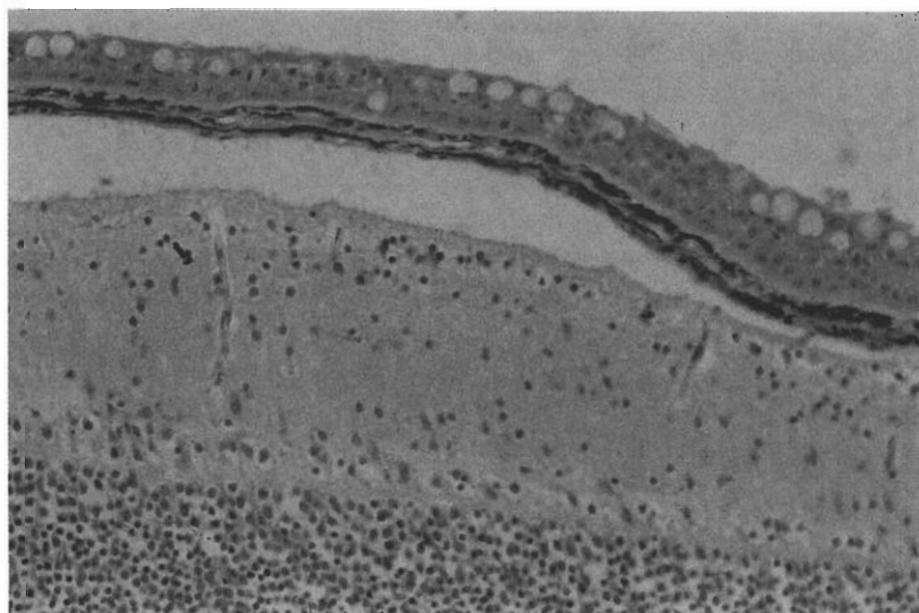


Fig. 2 - Trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*), avannotto. Cute. Evidenziazione immunistoichimica di lisozima nelle cellule dell'epidermide. ABC e diaminobenzidina, contrastata con Ematossilina. 20X.

di difese immunitarie sono inadeguati. (tabella 1 e 2). Fra l'epidermide e lo strato muscolare ci sono alcuni strati di cellule pigmentate, che conferiscono il colore al pesce. Nel derma sottostante, costituito prevalentemente da tessuto connettivo, sono contenute le squame.

L'integrità dell'epidermide è fondamentale per il mantenimento dell'equilibrio osmotico e la difesa dai microrganismi. Il processo riparativo delle ferite cutanee risulta estremamente rapido grazie alla migrazione di cellule che dallo strato malpighiano alla periferia della lesione, vanno a coprire il tessuto di granulazione chiudendo superiormente la ferita.

### *1.3 Branchie*

Le branchie sono costituite dall'arco branchiale, che è la principale struttura portante, dalle lamelle primarie (filamenti) e dalle lamelle secondarie (lamelle) innestate sulle precedenti. L'arco branchiale è ricoperto da un tessuto epidermico tipico dei teleostei, sotto il quale si trova abbondante tessuto linfatico, comprendente linfociti e, in molte specie, grosse cellule contenenti granuli acidofili. (fig. 4). Le lamelle primarie sono ricoperte da un epidermide di tipo mucoide, contenente nelle specie eurialine le c.d. "cellule del cloruro" che servono al pesce per l'osmoregolazione (fig. 3). Sono inoltre presenti linfociti, cellule fagocitarie, e grosse cellule di tipo granulocitario con granuli acidofili (fig. 4). Le branchie costituiscono una importante via d'entrata per molti microrganismi, pertanto sono protette da una forte produzione di muco. Inoltre, a livello di cellule epiteliali che rivestono le lamelle secondarie delle branchie di trota iridea, si sono evidenziate, con metodiche immunoistochimiche due enzimi che possiedono una efficace attività battericida: la tripsina e il lisozima. I processi infiammatori a livello branchiale determinano spesso iperplasia epiteliale con fusione di lamelle vicine.

## *2. FATTORI UMORALI ASPECIFICI*

- 2.1) Inibitori della crescita;
- 2.2) Inibitori di enzimi prodotti dai patogeni;
- 2.3) Sostanze inducenti lisi cellulare;
- 2.4) Precipitine e Agglutinine.

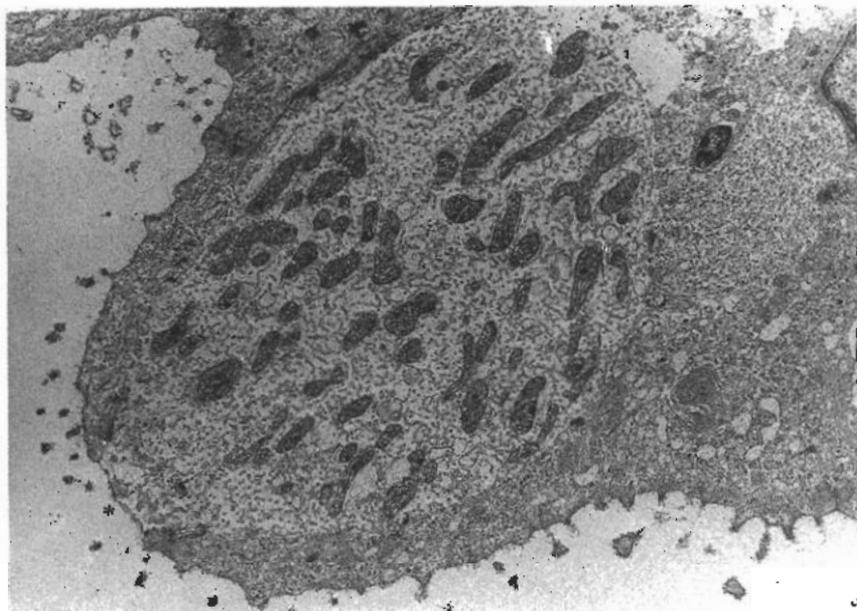


Fig. 3 - Trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*). Branchie. Tipica "cellula del cloruro" sporgente dalla mucosa branchiale. Si noti la "cripta" (\*) in prossimità del lume ed i numerosi mitocondri che ne assicurano l'elevata attività metabolica. Trota adattata all'acqua salata. Microscopia elettronica a trasmissione (4900x).

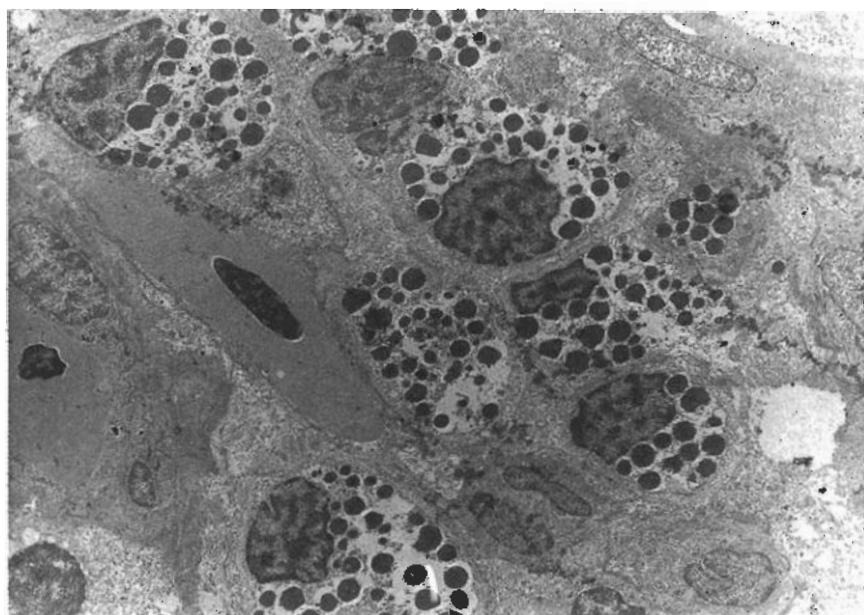


Fig. 4- Trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*). Branchie. Asse di una lamella primaria. Gruppi di cellule con grossi granuli citoplasmatici. Queste cellule costituiscono una importante difesa di tipo specifico, con una azione simile a quella dei granulociti di mammifero. Microscopia elettronica a trasmissione (2800x).

## 2.1) *Inibitori della crescita*

Transferrina

Ceruloplasmina

Metallotioncina

Interferone

### 2.1.1) Transferrina (PM ,80KDa)

Proteina globulare presente nel siero di tutti i vertebrati, inclusi i pesci. Manifesta forte tendenza a legare il ferro ed è un importante fattore di crescita per molti microrganismi. La transferrina esercita un importante effetto batteriostatico e fungistatico. Ritarda la moltiplicazione microbica fino a quando la risposta immune dell'animale può avere luogo. E' stata studiata nella carpa (*Cyprinus carpio*), nel salmone (*Oncorhynchus kisutch*) e nella trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*).

### 2.1.2) Ceruloplasmina

Proteina dotata di alta affinità per il rame ed altri cationi metalloivalenti. E' in grado di ossidare Fe ferroso a ferrico (forma che può legarsi alla transferrina). La funzione antimicrobica sembra essere dovuta prevalentemente alla attività ferrosidasiaca. E' stata isolata dal sangue di passera (*Pleuronectes platessa*).

### 2.1.3) Metallotioncina

Proteina a basso peso molecolare isolata dal fegato di passera. Particolarmente ricca di cisteina, manifesta tramite questo aminoacido una forte affinità per gli ioni metallici. La sua produzione viene stimolata anche dalla liberazione di endotossine batteriche. La sua funzione non è ancora del tutto chiarita.

### 2.1.4) Interferone

La sua importante attività antivirale è stata dimostrata nella carpa e nella trota iridea. L'azione è simile a quella dei mammiferi: l'interferone si lega a recettori cellulari, inducendo da parte della cellula la produzione di un sistema enzimatico inibente la sintesi delle proteine virali.

Nei pesci sono stati isolati l' IFN $\alpha$ , l'IFN $\beta$  e l'IFN $\gamma$ .

## 2.2) *Inibitori di enzimi Prodotti dai patogeni*

Inibitori delle proteinasi anti-serina  
Inibitore delle proteinasi anti-cisteina  
Inibitore della metalloproteinasi  
 $\alpha$ -2 macroglobina

### 2.2.1) Inibitori delle proteinasi anti-serina

Inibitore della proteinasi  $\alpha$ 1  
Antitrombina-3  
 $\alpha$ 2 - antiplasmina  
Inibitore del C1  
Inattivatore inter-  $\alpha$  tripsina

Inibitore della proteina  $\alpha$ 1

In origine era chiamato inibitore della tripsina, ma ora è nota la sua capacità di inibire tutte le proteinasi seriniche. E' formato da una singola catena polipeptidica.

Antitrombina 3

Controlla le proteinasi antiseriniche nel corso della coagulazione. Inoltre inattiva tripsina e chimotripsina.

$\alpha$ 2 antiplasmina

Forma complessi stabili con la plasmina, inibendone la funzione. Aumenta velocemente e in quantità significativa durante la fase acuta di reazione difensiva.

Inibitore del C1

E un componente del sistema del complemento. Inibisce C1s e C1r.

Inattivatore inter  $\alpha$ tripsina

Contiene ioni zinco e forma complessi inattivanti con tripsina e chimotripsina. Attivo nella fase acuta dell'inflammatione.

### 2.2.2) Inibitore delle proteinasi anti-cisteina

E presente in due forme a diverso P.M. (57 e 175 KDa) altamente specifiche nei confronti di 2 proteinasi anti-cisteina. Normalmente non è presente nel siero, può essere riscontrato solo in seguito a liberazione di alcuni enzimi dopo morte cellulare.

### 2.2.3) Inibitore della metalloproteinasi

Inibisce la collagenasi della cute, del liquido sinoviale reumatoide e dei granulociti. Il complesso che forma con gli enzimi è soggetto ad azione fagocitaria.

### 2.2.4) $\alpha$ -2 macroglobina

Molecola di PM=360 KDa, isolata dalla passera. Si attacca a tutte le proteinasi inducendo una variazione conformazionale del sito attivo che le rende incapaci di legare il substrato. E' coinvolta nella protezione dei salmonidi dalle proteasi extracellulari di *Aeromonas salmonicida*.

## 2.3) Sostanze inducenti lisi cellulare

Idrolasi

Lisozima

Chitinasi e chitobiasi

Proteinasi

Complemento

### 2.3.1) Idrolasi

Sono state identificate nei tessuti di pesce e risultano attive contro vari glicosidi

### 2.3.2) Lisozima

PM=12,5 - 15 KDa ( il lisozima della trota iridea ha il 71 % di omologia con quello umano) Funzione: attacca strutture presenti nella parete di batteri Gram(-); idrolizza la glicochitina ed ha un moderato effetto sulla chitina (componente della parete delle cellule fungine). Enzima riscontrato in vari pesci sia marini che di acqua dolce, a livello delle secrezioni, come il muco, e di molti tessuti, specialmente di quelli più soggetti ad aggressione batterica come il rene, il tratto alimentare, la milza, le branchie. E' presente anche nel siero. E' possibile evidenziare il lisozima su sezioni istologiche di materiale fissato in formalina, con una tecnica immunistochemica utilizzando un anticorpo policlonale per il lisozima dell'uomo. In questo modo viene rintracciato in vari tessuti (tabella 1 e 2) fra i quali la cute (fig. 2) di stadi giovanili di alcuni pesci. Il livello di lisozima prodotto è in relazione con: il periodo stagionale, il sesso, lo stadio di maturità sessuale, la stimolazione antigenica ed eventi stressanti che agiscono sul pesce.

Tabella n° 1 - Localizzazione immunistochemica di tripsina e lisozima in organi di trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*). Galcotti et al. (1995).

TROTA IRIDEA	Anticorpo anti-TRIPSINA UMANA	Anticorpo anti-TRIPSINA SALMONE	Anticorpo anti-LISOZIMA
LARVE	non testato	negativo	cute +
AVANNOTTI	cute ++ cellule mucosa gastrica ++ cellule epitelio branchiale +	cute ++ cellule mucosa gastrica ++ mucosa intestinale con cellule positive (verso il lume) branchie negative	cute + epiteliotubuli renali + globuli rossi + macrofagi? ++nel rene
PANCREAS ADULTI	negativo	granuli citoplasmatici ++/+++	granuli debolmente positivi
BRANCHE ADULTI	alcune cellule dell'epitelio con citoplasma abbondante +++ (macrofagi?)	negativo	cellule epitelio delle lamelle secondarie ++ cellule epiteliali desquamate ++ globuli rossi +

### 2.3.3) Chitinasi e chitobiasi

Riscontrate nel tessuto linfomieloide e nel sangue di vari pesci. La chitinasi ha un PM.=30 KDa.

### 2.3.4) Proteinasi

Il muco dei pesci contiene proteinasi tripsino-simili. Queste proteinasi sono inibite da componenti seriche. Sono molto efficaci nella distruzione di batteri Gram (-) (come per es. *Vibrio anguillarum*).

### 2.3.5) Complemento

Il complemento è un sistema biologico di difesa aspecifico che assicura un'efficace protezione contro infezioni sostenute da vari microrganismi. Nei mammiferi circa 20 glicoproteine, tra costituenti proprie e regolatori solubili o di membrana, presenti in circolo o nei tessuti in forma inattiva, fanno parte del sistema complementare. Le componenti più importanti sono quelle numerate dal C1 al C9. Le azioni principali del complemento sono quelle di:

- 1) provocare la lisi cellulare;
- 2) attivare cellule fagocitarie;

Tabella n° 2 - Localizzazione immunohistochimica di tripsina e lisozima in organi di branzino (*dicentrarchus labrax*). Galeotti et al. (1993).

BRANZINO	Anticorpo anti TRIPSINA UMANA	Anticorpo anti TRIPSINA SALMONE	Anticorpo anti LIZOZIMA
LARVE AL MOMENTO DELLA SCHUSA	Cellule epidermiche +++ su tutta la superficie corporea Cellule epiteliali del tubo digerente+	Negativo	Cute ++ Sacco vitellino + Cellule mucosa tratto digerente ++ (positività granulare citoplasmatica)
LARVE DI 17° GIORNI	Cellule epidermiche ++/+++ su tutta la superficie corporea Cellule mucose + tratto prossimale tubo digerente Cellule epiteliali in corrispondenza del retto	Negativo	Cute +/- Citoplasma epatociti +/- Mucosa stomaco e intestino +/- (positività granulare citoplasmatica)
AVANNOTTI	Cellule mucosa gastrica +/++ (positività granulare citoplasmatica)	Negativo	Cute negativa Rene anteriore: varie cellule con positività citoplasmatica +/++ (macrofagi?)
EPATOPANCREAS ADULTI	Negativo	Negativo	Non testato

3) effettuare l'opsonizzazione.

Gli studi sul complemento dei pesci sono iniziati tra gli anni '60 e '70. Ross e Jensen (1973) hanno dimostrato la presenza della componente C1 nel siero di un pesce cartilagineo, lo squalo. Nonaka et al. (1984) hanno evidenziato una alta attività emolitica da parte del complemento di trota iridea e hanno descritto il C3 e il C5. Numerosi studi seguenti hanno dimostrato chiaramente:

1) - L'attivazione del complemento tramite *via classica* in varie specie di pesci ossei marini e di acqua dolce come la lampreda (*Petromyzon marinus*) e la trota iridea;

2) - L'attivazione del complemento per *via alternativa* (emolisi indipendente dalla presenza di anticorpi) in vari pesci come la carpa la trota iridea e il pagro (*Pagrus major*).

*Labilità al calore.* Nei pesci di acque fredde il complemento presenta una discreta labilità al calore. L'attività emolitica del siero di trota iridea scompare dopo trattamento a temperature  $> 44^{\circ}\text{C}$  per 20'. Le condizioni per inattivare il complemento delle diverse specie ittiche sono variabili e difficili da standardizzare; tendenzialmente il complemento delle specie di acqua fredda viene inattivato a temperature più basse rispetto a quello di specie di acqua calda.

*Fattori che influenzano l'attività del complemento:*

1) Cationi bivalenti: il  $\text{Mg}^{2+}$  e il  $\text{Ca}^{2+}$  sono importanti per l'attivazione di entrambe le vie del complemento. Nella trota iridea la presenza di EDTA, chelante  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$ , induce una completa perdita di attività del complemento. Tuttavia l'emolisi spontanea si conserva.

2) È stata provato che esiste interferenza da parte del siero di una specie diversa con l'attivazione del C sia per via classica che alternativa. Questa interferenza sarebbe da attribuire alla competizione tra il complemento e un componente del siero (non ancora identificato) per l'attacco ai siti cellulari affini al complemento.

3) L'attivazione del C in assenza di anticorpo è possibile in presenza di alcuni lipopolisaccaridi derivati dalla parete dei batteri Gram (-).

*Effetto della temperatura sull'attività emolitica del C*

L'attività del C di trota iridea aumenta gradualmente passando dai  $15$  ai  $30^{\circ}\text{C}$ , ma cade rapidamente a  $37^{\circ}\text{C}$ . Il C di pesci di acque fredde è meno stabile rispetto a quello di mammifero perdendo il 30 - 60 % della sua attività se tenuto per 3 ore a temperature  $>30^{\circ}\text{C}$ . Per quanto riguarda invece i pesci di acque calde, esiste una relazione tra esposizione a basse temperature e calo dell'attività emolitica. Esperimenti effettuati sul pescegatto americano (*Ictalurus punctatus*) hanno dimostrato che un rapido decremento della  $T^{\circ}$  dell'acqua riduce l'attività emolitica del C. Questa azione è mediata probabilmente anche dall' $\text{NH}_3$  che a basse temperature fa risentire maggiormente i suoi effetti tossici. In condizioni di bassa  $T^{\circ}$  l'N ammoniacale totale e l' $\text{NH}_3$  non ionizzata contenuti nell'acqua, raggiungono livelli maggiori. L' $\text{NH}_3$  ed altri composti aminici (metilamina, etilamina, idrazina, idrossilamina) sono noti come inibenti l'attività del sistema del C, in seguito all'attacco in corrispondenza del legame tioestere sulle molecole del C3 e C4.

*Effetto opsonizzante esercitato dal C3 sui granulociti neutrofili*

Il complemento di carpa aumenta la fagocitosi di particelle estranee; il requisito essenziale è la fissazione sulle particelle del componente C3. Sulla

superficie dei granulociti neutrofili di carpa è stata identificata la presenza di recettori per il C3. Recettori per il C3 sono stati evidenziati, inoltre, sui macrofagi di salmone e trota iridea (il trattamento con tripsina determina la scomparsa del recettore di superficie per il C3, riducendo notevolmente l'effetto opsonizzante e quindi la fagocitosi).

#### 2.4) *Precipitine e agglutinine.*

Proteina c-reattiva

Anticorpi naturali

##### 2.4.1) Proteina c-reattiva

Nei mammiferi questa proteina è in grado di attivare il complemento; nei pesci il suo ruolo non è stato chiarito, ma sembra essere coinvolta nelle reazioni di ipersensibilità immediata. E' stata riscontrata nel siero normale e nelle uova di numerosi pesci ossei.

##### 2.4.2) Anticorpi naturali

Sostanze non precisamente definite, riscontrate nel siero e nelle uova di molti pesci.

Hanno attività agglutinante e precipitante su eritrociti, batteri e polisaccaridi. Probabilmente appartengono alle lectine o alle immunoglobuline.

### 3) *IMMUNITA' CELLULARE ASPECIFICA*

#### 3.1) *FAGOCITI*

Come nei mammiferi anche nei pesci esistono due cellule capaci di una discreta attività fagocitaria, i macrofagi e i granulociti neutrofili.

##### 3.1.1) *Monociti e Macrofagi*

I monociti dei pesci sono numerosi nel tessuto emopoietico del rene, ma si trovano anche circolanti nel sangue. Sono considerati i precursori dei macrofagi tissutali, capaci di migrazione dal sangue ai tessuti sede di processi infiammatori. I macrofagi hanno una vasta distribuzione in molti tessuti, compresi peritoneo e branchie, ma sono presenti soprattutto come macrofagi fissi nel rene, nella milza e in alcuni pesci anche nell'atrio del cuore. (Vedi paragrafo "Il sistema dei fagociti mononucleati"). Molti macrofagi dei pesci contengono melanosomi all'interno dei loro lisosomi, sono i c.d.

melanomacrofagi, particolarmente numerosi nel rene e nella milza. La melanina, contenuta in queste cellule, sembra originarsi da melanociti presenti nel rene stesso ed avrebbe importanti funzioni battericide.

### 3.1.2) *Granulociti neutrofili*

Nei pesci i granulociti neutrofili si trovano distribuiti nel rene, nella milza e circolanti nel sangue. La loro funzione fagocitaria, se pure ridotta rispetto a quella dei macrofagi, è stata ormai accertata anche per i pesci. Dal punto di vista morfologico i neutrofili dei pesci presentano molta analogia, a parte qualche eccezione, con quelli dei mammiferi.

Tab. 3 - Dimensioni dei granulociti neutrofili in alcune specie di pesci.

Specie	Nome comune	Dimensioni
<i>Pleuronectes platessa</i>	Passera	8 - 10 $\mu$
<i>Ictalurus punctatus</i>	Pescegatto americano	9 - 15 $\mu$
<i>Anguilla japonica</i>	Anguilla giapponese	10 - 15 $\mu$
<i>Cyprinus carpio</i>	Carpa	5 - 8 $\mu$
<i>Morone saxatilis</i>	Branzino americano	9 - 12 $\mu$

Nei granulociti neutrofili di molti pesci sono state evidenziate le seguenti attività enzimatiche: Fosfatasi acida, Cloroacetato esterasi, Perossidasi, Fosfatasi alcalina e Lisozima.

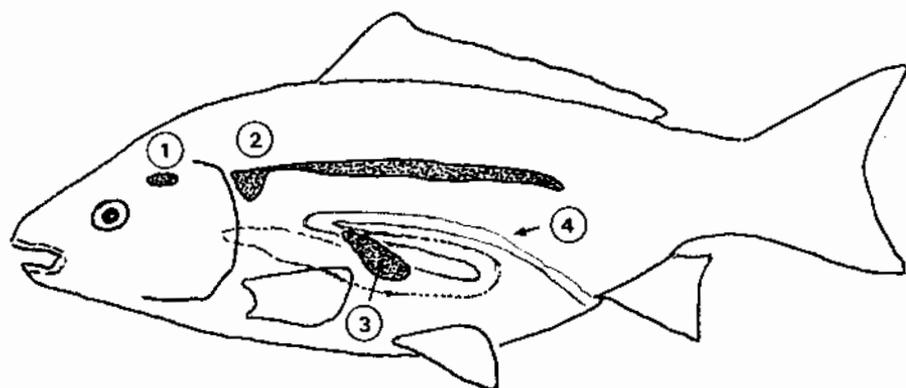
### 3.2) *CELLULE A CITOTOSSICITA NATURALE (NCC)*

Nei pesci sono state evidenziate cellule che presentano proprietà molto simili alle cellule "natural killer" (NK) dei mammiferi, che però non possono con certezza essere assimilate a queste. Le NCC sono state rintracciate in vari pesci e morfologicamente hanno l'aspetto di monociti. La loro azione citotossica è stata provata testandole con svariati tipi cellulari, ma sembra essere più esaltata quando le stesse cellule sono infettate da virus, o quando si rivolge verso cellule parassitarie.

## GLI ORGANI DEL SISTEMA IMMUNITARIO

I principali organi del sistema immunitario dei teleostei sono il timo, la milza e il rene anteriore o pronefro (Fig. 5). A questi deve essere aggiunto il tessuto linfatico associato all'intestino (GALT) che verrà trattato nel paragrafo 5. "Il sistema immunitario delle mucose".

Fig. 5 - Rappresentazione schematica dei principali organi del sistema immunitario dei pesci: 1) timo; 2) rene anteriore o pronefro; 3) milza; 4) tessuto linfatico associato all'intestino.



### 1) TIMO

Il timo dei pesci è un organo pari, localizzato sulla parete dorso-laterale del faringe, dal primo al quarto arco branchiale. A differenza dei mammiferi, è un organo molto superficiale, essendo disposto tra la membrana basale e l'epitelio mucoso della cavità branchiale.

La struttura è simile a quella dei mammiferi, anche se c'è poca differenziazione fra zona corticale e midollare. Il parenchima è costituito da tessuto linfoide il quale è quasi interamente composto da linfociti in vari stadi di sviluppo e sottili fibre argirofile di supporto, mentre all'esterno è rivestito da una capsula connettivale. I vasi sanguigni possiedono uno speciale endotelio con giunzioni strette, simili a quelle presenti nel timo dei mammiferi. In alcuni pesci si evidenziano numerosi macrofagi, talvolta in stretta associazione con i linfociti. In alcune specie sono state evidenziate strutture che assomigliano ai corpuscoli di Hassall. Il timo è più evidente nell'avannotto mentre diventa meno preminente nel pesce adulto, anche se

esistono grosse differenze legate alla specie. Infatti nei teleostei meno evoluti tendenzialmente presenta involuzione prima della maturità sessuale, mentre in quelli più evoluti permane anche dopo questo momento ed addirittura si può accrescere. Generalmente l'involuzione è molto più lenta, rispetto ai mammiferi, ed è caratterizzata da accumolo di tessuto connettivo.

Vengono di seguito riportati i punti ancora aperti sulla comprensione delle funzioni del timo nei pesci.

1) La superficialità in molte specie (di più nella trota, soprattutto soggetti giovani, meno nella carpa), e la presenza di grosse fenestrature nell'epitelio di rivestimento dell'organo, contrastano in parte con la necessità di segregazione dell'organo da parte dell'ambiente esterno per evitare che si creino fenomeni di tolleranza da parte delle cellule T verso determinati patogeni.

2) Come nei mammiferi, si suppone che il timo nei pesci rivesta una funzione di organo primario del sistema immunitario. Nel timo avviene la maturazione delle cellule T immunocompetenti? La timectomia non ha effetto sul tessuto linfatico del rene, anche se si osserva nel contempo marcata deplezione dei linfociti nella milza. La risposta anticorpale e il rigetto di allotrapianto è ancora conservato.

## 2) MILZA

E' l'organo che ha maggior somiglianza con il tessuto linfatico e soprattutto con i linfonodi di mammifero. E' di colore rosso-scuro o nero, con margini affilati ben definiti. E' situata in prossimità della grande curvatura dello stomaco, generalmente singola, anche se talvolta può essere suddivisa in milze più piccole. Esiste una capsula fibrosa priva di fibre muscolari e mancano anche le numerose trabecole connettivali che da questa entrano nella polpa, come accade per i mammiferi. I principali elementi costitutivi sono gli ellissoidi, la polpa e i centri melanomacrofagici (CMM).

Le arteriole spleniche terminano dividendosi in numerosi capillari con spessa parete, gli ellissoidi, che si aprono poi a loro volta negli spazi della polpa. Gli ellissoidi hanno un vaso assiale ricoperto da endotelio, circondato da una guaina di cellule reticolari sostenute da fibre reticolari (fig. 6). Gli ellissoidi contengono eritrociti e fagociti e sono capaci di trattenere grosse quantità di particelle dalla circolazione. I macrofagi qui presenti, dopo fagocitosi del materiale migrano dagli ellissoidi ai CMM, che spesso si trovano in prossimità dei vasi stessi. E' interessante sottolineare che antigeni, inizialmente trattenuti in altri siti dell'organismo, possono essere poi ricollocati nella milza, probabilmente trasportati dai macrofagi. Questa ipo-

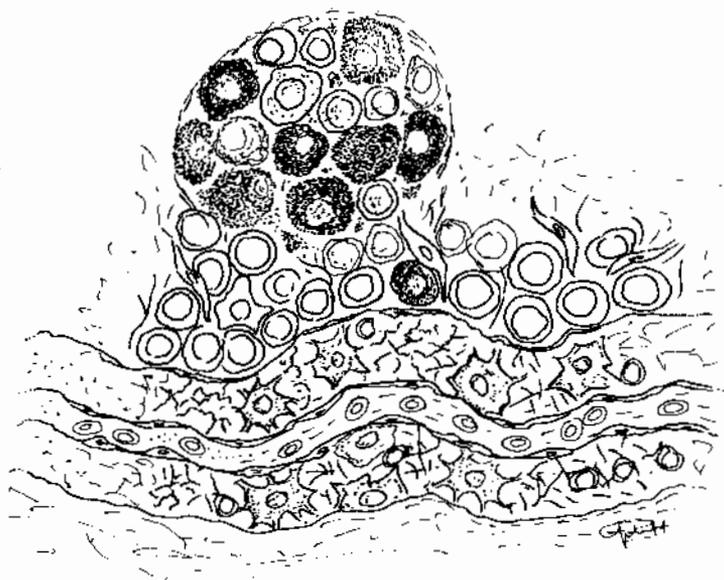


Fig. 6 - Rappresentazione schematica di un ellissoide della milza con in prossimità un centro melanomacrofagico.

tesi è stata provata nella trota iridea, dopo inoculo di batteri uccisi e controlli effettuati a 1 e 18 ore. Una situazione simile, con le dovute differenze, si osserva anche nei mammiferi dove linfociti B memoria migrano dai follicoli dei linfonodi alla polpa bianca che circonda le arteriole pennicillari nella milza.

La polpa splenica è costituita da tessuto sinusoidale, in parte simile a quello presente nel rene, nel quale sono trattenuti molti eritrociti, e da tessuto emopoietico. Quest'ultimo è principalmente ma non esclusivamente linfopoietico. In molte specie, come nella trota iridea, la milza è la sede di maggior produzione di eritrociti.

CMM sono generalmente situati in vicinanza dei vasi e sono circondati da una sottile membrana limitante di tipo reticolare. Il tessuto linfatico della milza è più organizzato nei teleostei più evoluti ma non raggiunge mai un alto livello di strutturazione. Generalmente è formato da cuffie di tessuto linfatico che circondano gli ellissoidi e i CMM associati. Nella carpa, dopo stimolazione antigenica, o in corso di malattie croniche, si osserva un aumento della polpa bianca, specialmente attorno ai CMM, mentre compaiono plasmacellule, insieme a gruppi di cellule pironinofile a livello degli ellissoidi. Con tecniche immunoistochimiche sono state evidenziate cellule

positive per la proteina S100 nella milza di carpa, trota e orata (Tab. 4). Tali cellule si presentano di grosse dimensioni, sono provviste di prolungamenti citoplasmatici e sono spesso in stretto contatto con linfociti; il loro aspetto e la positività alla proteina S100 le rende molto simili alle cellule Interdigitate Dendritiche (IDc) dei mammiferi. Le cellule IDc dei mammiferi sono cellule con funzione APc (Antigen Presenting cell) e sono importanti nell'iniziare la risposta immunitaria verso l'antigene; il rinvenimento di cellule simili anche negli organi linfatici di pesce potrebbe costituire una prova molto importante della presenza, anche nei pesci, di cellule capaci di esercitare una funzione APc.

### 3) *TESSUTO EMOPOIETICO RENALE*

Il tessuto interstiziale emopoietico forma in tutto il rene dei teleostei un supporto per l'apparato escretore vero e proprio, mentre nella porzione anteriore, definita "testa" del rene o pronfro, si trova esclusivamente tessuto emopoietico. Il tessuto emopoietico del rene è costituito da un sistema di sinusoidi ricoperti da cellule di tipo reticoloendoteliale simile a quello del midollo osseo dei mammiferi, fra i quali è interposto il tessuto linfatico costituito da linfociti e plasmacellule. La contemporanea presenza di queste due componenti fornisce la caratteristica principale di questo tessuto; infatti, a differenza del midollo osseo, il tessuto emopoietico renale ha anche una forte attività di tipo fagocitario e contiene inoltre cellule mature capaci di produrre anticorpi. Da questo punto di vista possiede una discreta somiglianza con i linfonodi.

Attorno alle vene e ai sinusoidi si osservano molti precursori della serie mieloide, i granuloblasti, che per le loro proprietà istochimiche sono considerati analoghi ai mieloblasti e ai mielociti presenti nel midollo osseo dei mammiferi.

Altra importante prerogativa del tessuto emopoietico dei teleostei è la costante presenza di cellule ricche di pigmenti, identiche a quelle descritte nella milza, che possono essere sparse nel tessuto o aggregate a formare dei centri. Queste cellule sono di due tipi principali: i melanociti e i melanomacrofagi.

Nei teleostei primitivi come i salmonidi si osserva una bassa specializzazione tissutale, mentre nei teleostei più evoluti come i ciprinidi e i pleuronectidi è già evidente un certo grado di specializzazione del tessuto emopoietico. Infatti in questi ultimi si osserva una costante aggregazione dei melanomacrofagi.

Tabella n°4 - Localizzazione immunistoichimica di proteina S-100 in organi di alcune specie di pesci

	MILZA	RENE	FEGATO	CUTE	CERVELLO
CARPA	Cellule simil macrofagiche, posizione in endoteliale e cellule RDCs-simili	Negativo	Cellule endotelio vasi sanguigni	Negativo	Nucleo e citoplasma di numerose cellule gliali
TROTA IRIDEA	Rare cellule RDCs-simili	Rare cellule RDCs-simili	Non testato	Cellule denitriche nello strato delle cell. pigmentate [?]	Nucleo citoplasma di numerose cellule gliali
BRANZINO	Non testato	Negativo	Non testato	Negativo	Nucleo e citoplasma di numerose cellule gliali
ORATA	Rare cellule simil macrofagiche vicine ai vasi	Non testato	Non testato	Non testato	Non testato
ANGUILLA	Negativo	Negativo	Negativo	Non testato	Non testato

E' stata dimostrata la ricircolazione linfocitaria dai tessuti periferici al rene: i linfociti che arrivano al rene con la circolazione sanguigna, entrano nel parenchima renale attraversando particolari vasi a parete sottile, e in circa 24 ore raggiungono i CMM.

Ugualmente, dopo stimolazione antigenica, nella carpa iniziano a comparire nel tessuto emopoietico aggregati sferici di cellule pironinofile. Questo tipo di risposta, che trova il suo massimo a circa tre settimane dalla stimolazione, precede il picco del titolo anticorpale serico, suggerendo un meccanismo di produzione anticorpale simile a quello che si osserva nei mammiferi. L'esatto ruolo degli aggregati di cellule pironinofile non è del tutto chiarito. Si pensa che questi possano evolvere in CMM e che possano avere funzioni analoghe ai centri germinativi dei vertebrati superiori. Studi di ME hanno confermato la presenza di plasmacellule nel rene ed è stato anche riscontrato che sono più numerose a questo livello che nella milza. Nella trota iridea, con una tecnica immunistoichimica e l'impiego di anticorpi policlonali per le Ig di questo pesce, sono state evidenziate plasmacellule sparse nel tessuto emopoietico o radunate in gruppetti in prossimità di aggregati di melanomacrofagi.

Ulteriore particolarità del tessuto emopoietico renale è quella di avere incluso al suo interno il tessuto surrenale, presente come isolotti rotondi od ovali, rivestiti da una sottile capsula connettivale.

## I MELANOMACROFAGI E I CENTRI MELANOMACROFAGICI (CMM)

I melanomacrofagi sono un particolare tipo di fagociti con citoplasma infarcito di melanina o di ceroidi e lipofuscine. Queste cellule formano spesso degli aggregati forniti di una discreta organizzazione che vengono definiti CMM. Oltre che nel tessuto interstiziale del rene, sono presenti anche nella milza, nel fegato e occasionalmente in altri siti come gonadi e tiroide.

Il numero e le dimensioni dei CMM appaiono incrementati in particolari situazioni come: malattie croniche, catabolismo eccessivo (prolungato digiuno), permanenza in acque inquinate, senilità.

Tabella 6 - Modalità di coltura e stimolazione di leucociti di pesce

SPECIE ITTICA	FONTE DI LEUCOCITI UTILIZZATA	TERRENO DI COLTURA**	MITOGENI ed ANTIGENI*	TEMP. °C	% CO <sub>2</sub>
<i>Pleuronectes</i> Winter flounder	milza	RPMI 1640	LPS	15°	5%
<i>Cyprinus carpio</i> Carp	reneant. milza sangue perif.	RPMI 1640 modificato	PHA IL-2 * <i>Trypanos. b.</i>	33°	5%
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Rainbow trout	reneant. timo milza sangue perif.	RPMI 1640	LPS + plasma omologo (cellule T e B) PHA (timociti) PHA+ vit C * <i>Aeromonas s</i> * <i>Vibrio ang.</i>	17°-19°	5% 10%
<i>Salmo salar</i> Atlantic salmon	reneant. timo-milza sangue perif.	RPMI 1640	LPS (cellule T e B) PHA (timociti)	19°	5%
<i>Oncorhynchus kisutch</i> Salmon	rene ant. sangue periferico	RPMI 1640	LPS + plasma omologo	17°	10%
<i>Lctalurus punctatus</i> Channel catfish	sangue perif.	L-15 AIM-V	LPS (cell.B) ConA(cell.T)	27°	5%
<i>Brevoortia tyrannus</i> Atlantic m.	milza rene ant.	HBSS RPMI	LPS PWM Pha	27°	5%

\* Gli antigeni inducono proliferazione in vitro nel caso in cui il pesce sia stato sensibilizzato.

\*\* In genere il medium colturale viene addizionato con siero fetale bovino o siero autologo al 5-10%.

Il colore dei CMM in pesci normali, varia dal rosa al bruno-dorato (ceroidi o lipofuscine), ma tende ad essere nero (melanina) nei pesci vecchi o malati.

I CMM, vera differenza con i mammiferi, variano nel loro grado di organizzazione, a seconda della specie. Nei teleostei meno evoluti, come i salmonidi, i melanomacrofagi sono più facilmente isolati o riuniti in piccoli aggregati distribuiti nel tessuto emopoietico. Il grado di melanizzazione varia con l'età, ma a tutte le età il pigmento presente è bruno scuro o nero ed ha le proprietà chimiche e biochimiche della melanina.

Nei teleostei più evoluti la quantità di pigmenti scuri presenti nei centri di pesci normali è generalmente poca, e la maggioranza del pigmento è più chiara. Dal punto di vista istochimico è lipofuscina. La morfologia dei CMM dei teleostei più evoluti è molto più definita. Sono generalmente nodulari, con una delicata capsula argirofila, e contengono oltre ai melanomacrofagi anche linfociti e cellule pironinofile. In molte specie sono strettamente associati ai vasi, e possono avere attorno una corona di linfociti. Macrofagi circolanti, ripieni di materiale fagocitato, generalmente di origine microbica, o prodotti metabolici di rifiuto come ceroidi o emosiderina, ritornano o migrano selettivamente ai CMM, che possono essere considerati come centri di "stoccaggio di rifiuti metabolici". E' possibile che nei pesci più evoluti i CMM perdano in parte la loro funzione di centri di potente azione di fagocitosi e "killing" verso i patogeni, compito che sarebbe svolto da strutture più evolute (aggregati di macrofagi simili ai follicoli ?); questa situazione invece rimarrebbe nei teleostei meno evoluti che conservano CMM ricchi di melanina con potente effetto battericida.

## **IL SISTEMA DEI FAGOCITI MONONUCLEATI (SFM)**

Le cellule dei teleostei che si possono considerare facenti parti del SRE sono:

- i promonociti degli organi emopoietici;
- i monociti del sangue e della linfa;
- i macrofagi del tessuto connettivo;
- i macrofagi fissi della cavità atriale del cuore.

Ci sono notevoli differenze dai mammiferi per quanto riguarda il SFM. Nei pesci i macrofagi fissi dell'atrio sono estremamente importanti, mentre non è descritta la presenza di cellule di questo tipo in animali filogeneticamente più evoluti. Nel fegato dei pesci, invece, non sembra esistere un corrispettivo delle cellule del Kupffer dei mammiferi.

Cellule giganti e cellule epitelioidi, che possono essere comprese nel sistema dei fagociti mononucleati, sono descritte in lesioni flogistiche croniche anche dei teleostei. Caratteristica interessante dei macrofagi dei teleostei è quella di formare degli aggregati, una volta che sono ripieni di materiale fagocitato. Molto spesso questi aggregati si rinvengono nei siti dei melanomacrofagi in tessuti ematopoietici, ma si possono frequentemente trovare, spesso pigmentati, all'interno o attorno a lesioni infiammatorie croniche.

## IMMUNITA' SPECIFICA

### 1) IMMUNOGLOBULINE

#### 1.1) Caratteristiche strutturali

Nei pesci gli anticorpi sono stati rintracciati a livello di molti fluidi tissutali (plasma, linfa, bile, muco della cute, muco intestinale). Nel sangue costituiscono dal 40 al 50 % delle proteine sieriche totali. Nella trota iridea i valori di immunoglobuline variano da 4,5 a 10,8 g/100 ml. Il sistema vascolare del pesce è discretamente permeabile alle Ig sieriche:

PESCE contenuto di Ig		MAMMIFERO contenuto di Ig	
siero +++++	linfa ++++ (solo 20% in meno)	siero ++++++ maggioranza	linfa {+} quasi assenti

L'emivita degli anticorpi circolanti sembra abbastanza varia:

Carpa	12 giorni
Perciformi (Sarago)	16 giorni
Salmonc coho	49 ore a 12°C

Caratteristica particolare delle immunoglobuline di pesce è la presenza di una unica classe. La forma di immunoglobulina prevalente è quella tetramericata costituita da quattro subunità formate ciascuna da 2 catene pesanti (H) e da 2 catene leggere (L) (fig. 7). Le quattro subunità sono unite tra loro tramite ponti disolfuro che collegano le catene H. Come rappresentato dalla tabella 3, esistono anche Ig di tipo dimerico e monomero, che non sono state comunque rintracciate in tutti i pesci. In base al PM della catena

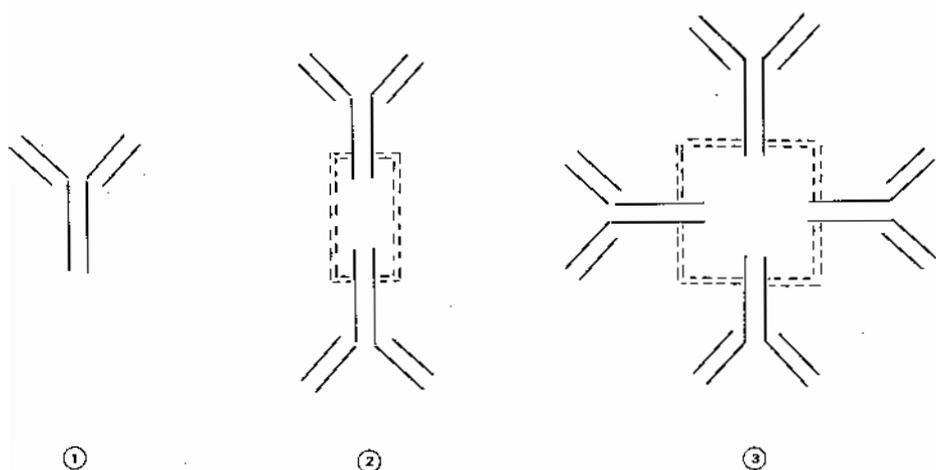


Fig. 7 - Rappresentazione schematica delle principali forme di immunoglobuline rintracciate nei teleostei. 1)Ig monomerica; 2)Ig dimerica; 3)Ig tetrameric.

pesante, ai ponti disolfuro intercatena, al tipo di aminoacidi e al contenuto di carboidrati, le immunoglobuline dei pesci mostrano una forte somiglianza con le IgM dei mammiferi. Verranno di seguito definite come IgM.

Esiste solo un gruppo di pesci, quello con parziale respirazione simile agli anfibi ("lungfish") che possiede una seconda classe di Ig monomeriche di 7S. Nei pesci cartilaginei, invece, le IgM sono di due tipi: pentameriche e monomeriche. L' IgM di teleosteo è una molecola ad alto peso molecolare composta da 4 subunità (8 catene pesanti, 8 catene leggere) con coefficiente di sedimentazione 16S e P.M. di 700.000. Alcune specie di pesce (passera) possiedono anche una forma monomerica di IgM di 7S, non considerata comunque come classe a sè, mentre altre specie come i salmonidi e la carpa hanno solo tetrameri. In alcuni pesci le IgM presenti nella bile sono dimeri, formati da due catene contrapposte, che presentano una singolare somiglianza con i dimeri IgA dei mammiferi. Sono state ritrovate anche immunoglobuline nelle uova di carpa e passera, suggerendo la possibilità di un trasferimento di anticorpi materni. I dati forse più completi al riguardo sono quelli attinenti il pesce rosso, nel quale in situazioni di prolungata

immunizzazione si formerebbero principalmente LMWlg (immunoglobuline a basso P.M.) che sarebbero antigenicamente ed elettroforeticamente distinte dai polimeri HMWlg (immunoglobuline ad alto P.M.) A parte questo dato nessuna ricerca prova l'esistenza di uno "shift" immunoglobulinico come nei mammiferi.

### 1.2) Subclassi Immunoglobuliniche

La specializzazione funzionale delle differenti classi di Ig nei mammiferi è una proprietà che deriva dalla diversa struttura della catena pesante (H) che ne determina la classe. Nei pesci, a parte casi particolari, non sono descritte differenti classi di immunoglobuline. Nell'ambito, comunque, delle IgM sembra esistere una eterogeneità, che potrebbe riflettere anche un diverso repertorio funzionale. Nel sarago (*Diplodus sargus*), per esempio, si sono rintracciate: IgM1 - monomeriche; IgM2 - dimeriche; IgM4 - tetrameriche, caratterizzate da differenti P.M. delle catene pesanti.

Tab. 5 - Differenti subclassi di immunoglobuline rintracciate nel sarago.  
(Da Lobbe et al. 1981, parzialmente modificata)

Subclasse	P.M. Catena pesante	Localizzazione
IgM1	45 KDa	siero
IgM2	55KDa	bile
IgM2	70KDa	muco cutaneo
IgM4	70KDa	muco cutaneo, siero

Con l'avvento degli anticorpi monoclonali e con il miglioramento delle tecniche di separazione delle proteine si sono ottenuti ulteriori dati molto interessanti. Per le immunoglobuline del pesce gatto americano sono stati ottenuti tre anticorpi monoclonali che riconoscono tre differenti tipi di catene H. Inoltre sono stati ottenuti due anticorpi monoclonali che riconoscono differenti catene L. Utilizzandoli in prove di cromatografia per affinità, si sono evidenziate anche differenti percentuali dei due tipi di catene L: approssimativamente il 60 % delle Ig sieriche sono definite da uno dei due monoclonali (3F12) e il 40% dall'altro (1G7). Analisi aminoacidiche potranno definire se si tratta di differenti catene L come nel caso dei mammiferi (catene K e catene lambda).

### 1.3) Eterogeneità funzionale delle Ig di pesce

Si sta quindi definendo una sorta di eterogeneità funzionale delle Ig di pesce che può correlarsi a differenze strutturali. Infatti, mentre l'attività agglutinante è facilmente dimostrabile per molte Ig di pesce, lo è molto meno l'attività precipitante.

In alcuni pesci teleostei, infatti, le IgM4 (16S) hanno alta attività agglutinante per la BSA, mentre le IgM1 (7S) non possiedono attività agglutinante. Nella cernia (*Epinephelus spp.*) le IgM4 (16S) hanno forte attività precipitante a differenza delle le IgM1 (7S).

Nella trota iridea le IgM1 e Le IgM4 sieriche hanno catene L identiche, mentre le catene H differiscono nel tipo di peptidi, P.M. e immunoreattività. Dal punto di vista funzionale si osservano evidenti differenze: infatti, mentre le IgM1 hanno bassa capacità di attivare il complemento e solo per via alternativa, le IgM4 hanno attività 100 volte maggiore e possono attivarlo sia per via classica che per via alternativa.

Inoltre sono state trovate variazioni stagionali nell'attività agglutinante e citolitica degli anticorpi di trota iridea: in inverno per es. il titolo citolitico è più basso, così come la produzione di IgM1.

Questi dati supportano l'idea che nei teleostei sia avvenuta una diversificazione filogenetica delle Ig. Non è ancora accertato se queste differenti forme di Ig hanno anche differenti funzioni biologiche.

### 1.4) Funzioni delle Ig di pesce

A dispetto delle scarse informazioni presenti sulle Ig di pesce, le loro funzioni non appaiono troppo dissimili da quelle delle più conosciute Ig di mammifero. Le principali funzioni delle Ig di pesce vengono di seguito schematizzate.

1.4.1) Neutralizzazione di virus - E' questa una funzione importante delle Ig dei pesci (neutralizzano anche tossine batteriche).

1.4.2) Attivazione del complemento - Le immunoglobuline di pesce possono attivare il C per via classica o per via alternativa. Come per i mammiferi è richiesta la presenza di  $Ca^{2+}$ . Non tutte le Ig di pesce hanno lo stesso potere attivante il C.

1.4.3) Opsonizzazione di particelle - Nei mammiferi i fagociti hanno recettori per la porzione Fc dell'anticorpo; le IgG hanno potere opsonizzante mentre le IgM non lo possiedono. Nella passera non è stata osservata attività opsonizzante delle Ig. Nella trota iridea, in assenza di C, la presenza di

anticorpi specifici per *Yersinia ruckeri* (l'agente eziologico della "bocca rosa") aumenta notevolmente la fagocitosi del batterio. Questo non accade se ad *Y.Ruckeri* si sostituisce *Aeromonas salmonicida* (l'agente eziologico della "foruncolosi"). Questo proverebbe che, a differenza dei mammiferi, le IgM di alcune specie di pesce possono avere un ruolo come opsonine, grazie anche alla presenza di recettori specifici sui fagociti.

1.4.4) Ipersensibilità - Anche in questo caso si osserva una forte differenza con i mammiferi, dove le reazioni di ipersensibilità sono legate alle IgE e ai mastociti. Soltanto in un numero molto limitato di pesci, è stata dimostrata la presenza di mastociti nei tessuti, ma non si hanno dati sull'esistenza di anticorpi simili alle IgE. E' interessante considerare, però, che nel pesce rosso (*Carassius auratus*) sono state riportate osservazioni di reazioni di tipo anafilattico indotte dopo sensibilizzazione con antigene specifico. Non si esclude quindi l'importanza di reazioni di tipo anafilattico soprattutto nel caso di vaccinazioni.

1.4.5) Alcune considerazioni conclusive sulle Ig - Dal punto di vista della immunità umorale il pesce appare filogeneticamente primitivo se confrontato con i vertebrati di classi superiori dove si hanno da 2 a 5 distinte classi di Ig. E' possibile che l'evoluzione di classi multiple di Ig a basso P.M. abbia cercato di seguire l'evoluzione di un sistema vascolare efficiente, idoneo allo spostamento via aria o alla locomozione terrestre. Infatti, la forte pressione sanguigna, presente negli uccelli e nei mammiferi, ha richiesto la formazione di giunzioni strette e resistenti fra le cellule endoteliali, allo scopo di prevenire l'essudazione di fluidi plasmatici e proteine. Questo avrebbe determinato l'impossibilità da parte delle grosse macromolecole di Ig ad uscire per raggiungere gli interstizi tissutali, ed avrebbe favorito l'evoluzione di forme di Ig a basso P.M.

Nel pesce, al contrario, le diverse esigenze metaboliche consentono l'esistenza di un sistema vascolare con bassa pressione e ampie fenestrate endoteliali, che lasciano fuoriuscire le macromolecole di Ig. Questo non avrebbe determinato nel pesce la formazione di Ig a basso P.M. Una eccezione la troviamo a livello cutaneo dove, per mantenere una buona integrità dell'organismo, l'elitelio esterno richiede giunzioni cellulari strette; è significativo perciò che le IgM secretorie dei teleostei siano dimeriche. L'eterogeneità strutturale delle IgM dei pesci è ormai evidente. La specializzazione funzionale delle classi di Ig dei mammiferi si può rispecchiare nelle subclassi delle IgM dei pesci.

## 2) LINFOCITI

Nel pesce i linfociti si trovano nella circolazione sanguigna, negli organi linfoidei e in alcuni tessuti. Contrariamente ai linfociti dei vertebrati superiori, quelli di pesce non sono stati ancora ben caratterizzati. Numerosi dati suggeriscono, comunque, una dicotomia dei linfociti anche nei pesci. Uno dei primi metodi per distinguere i linfociti B dai T, che ancora viene utilizzato, è stato quello della marcatura delle immunoglobuline di superficie. Esistono infatti numerosi anticorpi poli o monoclonali che riconoscono immunoglobuline di trota, carpa, pesce gatto americano, branzino ecc. Grazie all'utilizzo di questi anticorpi si è potuto distinguere linfociti B Ig (+) da cellule linfatiche Ig (-) (di tipo T o NC). Inoltre sono stati ottenuti numerosi anticorpi monoclonali (MoAb) capaci di marcare molecole presenti sulla membrana di cellule linfatiche di pesce. Di seguito ne vengono riportati alcuni:

- 13C10 - questo MoAb reagisce con linfociti di pesce gatto americano Ig (-), ma non con quelli Ig (+). Riconosce la maggior parte dei timociti, i neutrofili e i trombociti.

- WC112 - MoAb per Ig sieriche di carpa, marca la maggior parte delle plasmacellule e un subset di linfociti probabilmente della linea B (20 - 30%). Al contrario di quanto avviene nelle cellule B di mammifero, le molecole Ig sono riunite in "clusters" sulla superficie cellulare.

- WCT23 - MoAb contro timociti di carpa, marca un numero molto elevato di linfociti, quindi non può essere considerato un marcatore specifico per le cellule T. Inoltre marca i granulociti e cross reagisce con le Ig. Probabilmente riconosce un determinante antigenico comune presente su varie membrane o molecole del siero, comprese le Ig.

- UB13 - MoAb contro timociti e cellule nervose di razza (*Raja clavata*), che riconosce anche timociti di carpa, rana, tartaruga, pollo e ratto. Riconosce probabilmente un determinante di superficie che si è conservato nell'evoluzione.

- sono stati ottenuti anche MoAbs che riconoscono frazioni leucocitarie di salmone atlantico (*Salmo salar*).

Tutti questi anticorpi, come molti altri che non vengono riportati, hanno dimostrato di possedere differente affinità per specifiche sottopopolazioni linfocitarie che sono tuttavia ancora da definire. A prova dell'ipotesi dell'esistenza di differenti tipi di linfociti sono le sperimentazioni che hanno dimostrato la presenza anche nel pesce dell'effetto carrier-aptene. Nel pesce rosso si è visto, infatti, che una buona produzione di anticorpi si ha soltanto verso

un aptene coniugato con un carrier già usato nella prima stimolazione. Le cellule che operano nel riconoscimento del carrier e che cooperano nella produzione di anticorpi sarebbero probabilmente linfociti T del tipo "helper" dei mammiferi. Queste cellule si differenzierebbero nel timo. Per quanto concerne i sistemi di coltura e stimolazione di leucociti di pesce, numerose sono le esperienze al riguardo presenti in letteratura. Le più significative vengono riportate nella tabella 6. Da questa si evince che, a parte poche eccezioni, per quasi tutte le specie la temperatura di incubazione si discosta molto da quella normalmente usata per i leucociti di mammifero (37°C), oscillando da un minimo di 15° a un massimo di 27°C. Sono generalmente simili, invece, i terreni di coltura (fra i più usati l'RPMI 1640) e i mitogeni utilizzati per promuovere la stimolazione cellulare (buoni risultati con PHA e ConA). Le fonti preferenziali di leucociti sono il rene anteriore e il sangue periferico.

Anche nei linfociti di pesce si è evidenziata una differente capacità di rispondere alla stimolazione con mitogeni: tendenzialmente i linfociti che presentano Ig di superficie sono più responsivi a LPS, mentre quelli che non hanno Ig di superficie sono stimolati più attivamente da ConA e PHA.

### 3) IMMUNITA' CELLULO-MEDIATA (CMI)

Prove dell'esistenza di una efficace risposta immunitaria di tipo celluloso mediato sono ormai numerose anche nel caso dei pesci. Infatti molti dei test "in vitro" che vengono utilizzati per lo studio e la valutazione della CMI nei mammiferi sono stati adottati con successo anche nei pesci. Fra questi sono di valido ausilio:

- 1) il test della citotossicità
- 2) la reazione leucocitaria mista (MLR);
- 3) l'inibizione della migrazione macrofagica;
- 4) il test dell'attività macrofagica;
- 5) la blastizzazione linfocitaria indotta dall'antigene.

Poco si conosce al riguardo del ruolo giocato dalla CMI nella patogenesi delle malattie batteriche, virali e parassitarie. Nella trota iridea è stata descritta una tipica risposta immunitaria di tipo ritardato (IV tipo) verso *Mycobacterium tuberculosis*.

Il rigetto di un allotrapianto è stato osservato e descritto nei pesci cartilaginei e nei più evoluti pesci ossei, con la differenza che in questi ultimi la reazione di rigetto si esplica più velocemente. E' stato notato anche che allotrapianti ripetuti effettuati con lo stesso tessuto accelerano il tempo

di rigetto. Il tessuto che viene rigettato si presenta infiltrato di linfociti e mostra gravi alterazioni a livello vascolare e nelle cellule pigmentate.

Per quanto riguarda le molecole omologhe agli antigeni del Complesso Maggiore della Istocompatibilità (MHC) dei mammiferi, se ne sospetta l'esistenza pure nei pesci, anche se al momento non esistono prove certe dell'esistenza di un sistema della istocompatibilità ugualmente articolato. La carpa sembra possedere molecole di membrana omologhe alle catene alfa degli MHC di Classe I e alle catene beta degli MHC di Classe II.

#### 4) CITOCHINE

Sull'esistenza e la funzione delle citochine nei pesci, numerose informazioni sono scaturite dalle ricerche effettuate da Secombes (1991) e più recentemente da Ahne (1993, 1994), condotte principalmente sui salmonidi. E' stata provata la liberazione da parte dei monociti di una molecola simile alla interleuchina-1, e da parte dei linfociti di una molecola che presenta forte analogia con la interleuchina-2. Inoltre dai leucociti di trota iridea, stimolati con ConA, si è evidenziata la produzione di IL-1 $\alpha$ , IL-3 e IL-6. Recentemente nel siero di alcuni pesci è stato evidenziato TNF  $\alpha$ .

#### 5) SISTEMA IMMUNITARIO DELLE MUCOSE (SIM)

Le ricerche effettuate sul SIM dei pesci sono abbastanza limitate ma stanno avendo un recente incremento visto l'accresciuto interesse per la possibilità di stimolazione dell'immunità locale con sistemi di vaccinazione per via orale. Per una più corretta trattazione dell'argomento è opportuno richiamare separatamente i siti dove nel pesce avviene preferenzialmente una risposta immunitaria di tipo locale.

##### *Branchie*

Le branchie rivestono un ruolo importante nell'opera di trattenimento di antigeni (particolati) provenienti dall'acqua. A livello branchiale viene attuata una attiva fagocitosi ad opera del sistema dei fagociti mononucleati che delimitano i vasi sanguigni delle lamelle secondarie. Nel corso di vari processi infettivi a livello branchiale si accumulano numerosi linfociti, a prova dell'importante azione di barriera che questo organo può esercitare.

##### *Cute*

Il muco che ricopre la cute contiene frazioni del complemento e Ig dimeriche che non derivano per essudazione dai vasi sanguigni, ma sono più probabilmente prodotte localmente. Nell'epidermide sono presenti linfociti e

talvolta plasmacellule. Esistono inoltre numerosi macrofagi e cellule Langhan-simili, che fanno sospettare una processazione locale degli antigeni che penetrano attraverso la cute e la possibilità di indurre una risposta locale.

### *Intestino*

La presenza di Ig nell'intestino può originare dalla secrezione che proviene dalla mucosa o dalla bile. La mucosa dell'intestino e la lamina propria sono popolate da macrofagi, linfociti e plasmacellule, anche se manca una vera organizzazione di queste cellule in un tessuto linfatico associato alla mucosa. La vaccinazione per *Vibrio anguillarum*, effettuata nella trota per via orale, sembra stimolare una risposta locale, anche se ancora non si conosce esattamente come questo possa avvenire. E' stata recentemente dimostrata una endocizzazione di antigeni proteici da parte degli enterociti di carpa, con trasferimento nello spazio intercellulare degli antigeni stessi, che possono così venire a contatto con macrofagi e linfociti. Nei mammiferi è risaputo che antigeni processati a livello intestinale stimolano una forte risposta immunitaria locale, ma inducono anche cellule soppressorie che abrogano o comunque attenuano la risposta sistemica. Nella trota iridea la somministrazione orale di antigeni di *Aeromonas salmonicida* risulta in una soppressione della risposta sistemica umorale verso l'antigene iniettato. Questi dati, che presentano forte analogia con quanto accade nei mammiferi, fanno supporre l'esistenza anche nei pesci di un sistema immunitario delle mucose. A questo riguardo indagini condotte da Secombes (1991) provano che i linfociti isolati dall'intestino di trota sono funzionalmente attivi in vitro e sembrano avere un importante ruolo difensivo in vivo. Queste cellule liberano grosse quantità di IFN gamma aumentando notevolmente la fagocitosi dei batteri da parte dei macrofagi. In più, i macrofagi fissi intestinali dimostrano di possedere una forte attività fagocitaria, mostrano un efficace "respiratory burst" e liberano fattori chemiotattici che influenzano la migrazione di leucociti dal rene anteriore. Questi dati in ultima analisi spiegherebbero come nei pesci possano svilupparsi, a livello intestinale, imponenti reazioni infiammatorie in risposta a parassitosi. Tali reazioni verrebbero rafforzate dalle cellule granulari eosinofile (soggette a degranolazione) presenti in numero elevato nella lamina propria dell'intestino. La possibilità, da parte dei linfociti presenti nell'intestino, di liberare fattori che "up-regolano" la funzione battericida dei macrofagi residenti ha una grossa implicazione difensiva. Nei pesci è stato provato che proprio i linfociti intestinali, rispetto a quelli di altri distretti, sembrano produrre una maggior quantità di IFN $\gamma$ . Questo avvalorava l'ipotesi che nei pesci l'immunità locale a livello intestinale

può giocare un ruolo importante nella risposta difensiva specifica contro molti patogeni. Questa azione svolta dal SIM, fino ad ora sottovalutata, potrebbe giustificare gli innumerevoli sforzi volti a ricercare nuovi e più efficaci sistemi di vaccinazione.

## RINGRAZIAMENTI

Ringrazio la Dr.ssa Donatella Volpatti per la collaborazione prestata nelle ricerche che hanno supportato questa relazione e nella stesura di alcune parti del manoscritto. Un ringraziamento anche alla Dr.ssa Laura D'Angelo e al Sig. Pierluigi Bagatella per l'allestimento dei preparati istologici e l'effettuazione delle prove immunoistochimiche.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Agius C. (1985) *The melano-macrophage cells of fishes: A review*. In Fish Immunology (M. J. Manning and M. Tatner, eds) pp. 85-106, Academic Press, London.
- 2) Ahne W. (1993) *Presence of interleukins (IL-1, IL-3, IL-6) and the tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) in fish sera*. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 13(3),106-107.
- 3) Ahne W. (1994) *Induced interleukin (IL-1 $\alpha$ , IL-3, IL-6) production in vitro by leukocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)*. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 14(1), 33-35.
- 4) Ellis A.E. (1980) *Antigen-trapping in the spleen and kidney of the plaice, *Pleuronectes platessa**. J. Fish Dis., 3, 413-26.
- 5) Ellis A.E. (1981a) *Non specific defence mechanisms in fish and their role in disease processes*. Dev. Biol. Stand., 49, 337-52.
- 6) Ellis A.E. et al. (1976) *Defence mechanisms in fish. I. A study of the phagocytic system and the fate of intraperitoneally injected particulate material in the plaice (*Pleuronectes platessa*)*. J. Fish Biol., 8, 67-78.
- 7) Ellis A.E., Grisley M.S. (1985) *Serum antiproteases of salmonids: Studies on the inhibition of trypsin and the proteolytic activity of *Aeromonas salmonicida* extracellular products*. In Fish and Shellfish Pathology, ed. A. E. Ellis, pp. 85-96. London: Academic Press.
- 8) Evans D. L. et al. (1984) *Non-specific cytotoxic cells in fish (*Ictalurus punctatus*). IV. Target cell binding and recycling capacity*. Dev. Comp. Immunol., 8, 823-33.
- 9) Faisal M., Hargis Jr W.J. (1991) *Augmentation of mitogen-induced lymphocyte proliferation in Atlantic menhaden, *Brevoortia tyrannus*, with Ulcer Disease Syndrome*. Fish & Shellfish Immunology 2, 33-42.
- 10) Galeotti M., Lanari D. (1989) *Aspetti istologici di branchie di trota iridea (*Salmo gairdneri* R.) adattata all'acqua dolce e all'acqua salata*. Zootecnia e Nutrizione Animale, 15, 413.
- 11) Galeotti M. et al. (1991) *La Necrosi Ematopoietica Infettiva della trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*): indagine istologica ed immunoistochimica*. Bollettino Societ Italiana di Patologia Ittica, 7, 22.

- 12) Galeotti M. et al. (1993) *Immunohistochemical study of fish lymphoid organs with antibody against S-100 protein*. Europ. Ass. of Fish Path. 6th International Conference. Brest, France.
- 13) Galeotti M. et al. (1993) *Immunohistological localization of trypsin in Sea-bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae at different stages of life*. Europ. Ass. of Fish Path. 6th International Conference. Brest, France.
- 14) Galeotti M. et al. (1994) *Indagine istologica e immunoistochimica in branzini (*Dicentrarchus labrax*) infettati sperimentalmente con *Pasteurella piscicida**. Convegno internazionale "Giornate di Acquacoltura", Cuneo (1994).
- 15) Graham (1990) *Do fish lymphocytes secrete interferon-gamma?* Journal of Fish Biology, 36(4), 563-73.
- 16) Griffin B.R. (1983) *Opsonic effect of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) antibody on phagocytosis of *Yersinia ruckeri* by trout leucocytes*. Dev. Comp. Immunol., 7, 253-60.
- 17) Hamers R. (1994) *Studies on Carp lymphoid cells from kidney, peripheral blood and spleen stimulated in vitro with blood parasites and super-antigen*. Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol., 14(6), 191.
- 18) Hardie L.J. et al. (1993) *In vitro addition of vitamin C affects rainbow trout lymphocyte responses*. Fish & Shellfish Immunology 3, 207-219.
- 19) de Kinkelin P. et al. (1984) *Immunisation des poissons contre les viroses sévissant en eau froide*. In *Symposium sur la vaccination des poissons*. Off. int. Epiz. Paris, 189-224.
- 20) Lamers C.H.J., De Haas M.J.H. (1985) *Antigen localization in the lymphoid organs of carp (*Cyprinus carpio*)*. Cell Tissue Res., 242, 491-8.
- 21) Lobb C.J., Clem L.W. (1981) *The metabolic relationships of immunoglobulins in fish serum, cutaneous mucus and bile*. J. Immun., 127, 1525-9.
- 22) MacArthur J.I., Fletcher T.C. (1985) *Phagocytosis in fish*. In Fish Immunology, ed. M. J. Manning & M. F. Tatner, pp. 29-46. London: Academic Press.
- 23) Manning M.J., Mughal M.S. (1985) *Factors affecting the immune responses of immature fish*. In Fish and Shellfish Pathology, ed. A. E. Ellis, pp. 27-40. London: Academic Press.
- 24) Nagelkerke L.A.J. et al. (1990) *Oxygen uptake of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* phagocytes following stimulation of the respiratory burst*. J. exp. Biol., 154, 339-53.
- 25) Nonaka M. et al. (1984) *Purification of a major serum protein of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) homologous to the third component of mammalian complement*. J. biol. Chem., 259, 6327-33.
- 26) Reitan L.J., Thuvander A. (1991) *In vitro stimulation of salmonid leucocytes with mitogens and with *Aeromonas salmonicida**. Fish & Shellfish Immunology 1, 297-307.
- 27) Rijkers G.T. (1982) *Kinetics of humoral and cellular immune reactions in fish*. Dev. Comp. Immunol., Suppl. 2, 93-100.
- 28) Roberts R.J. (1989) "Fish Pathology", ed. Baillière Tindall, second edition.
- 29) Roberts R.J. (1975b) *Melanin containing cells of teleost fish and their relation to disease*. In The Pathology of Fishes, ed. W. E. Ribelin & G. Migaki, pp. 399-428. Madison, Wis.: University of Wisconsin Press.
- 30) Ross G.D., Jensen J.A. (1973). *The first component (C1n) of the complement system of the nurse shark (*Ginglymostoma cirratum*)*. 1. Hemolytic characteristics of partially purified. Clin. J. Immunol. 110:175-182.

- 31) Sakai D.K. (1992) *Repertoire of complement in immunological defense mechanisms of fish*. Annual Rev. of Fish Diseases, 223-247.
- 32) Secombes C.J. et al. (1982a) *The effect of primary and secondary immunization on the lymphoid tissues of carp, Cyprinus carpio L.* J. exp. Zool., 220, 277-87.
- 33) Secombes C.J. et al. (1982b) *Localization of immune complexes and heat-aggregated immunoglobulin in the carp, Cyprinus carpio L.* Immunology, 47,101-5.
- 34) Secombes C.J. (1991) *The phylogeny of cytokines*. In "The Cytokine Handbook" Academic Press Limited. 387-412.
- 35) Smith P.D. (1982) *Analysis of the hyperosmotic and bath methods for fish vaccination: comparison of uptake of particulate and non-particulate antigens*. Dev. Comp. Immunol., Suppl. 2, 181-6.
- 36) Stolen J.S. et al. (1986) "*Fish Immunology*", ed. Elsevier.
- 37) Stolen J.S. et al. (1990) "*Techniques in Fish Immunology*", 1st edition, SOS Publications.
- 38) Varichak T. (1938) *Studies on endothelial cells in the liver of fishes*. Z. Zellforsch. mikrosk. Anat., 27, 46-51.
- 39) Warr G.W. et al. (1983) *Thymocyte plasma membrane of the rainbow trout, Salmo gairdneri: associated immunoglobulin and heteroantigens*. Comp. Biochem. Physiol. B., 76, 515-21.
- 40) Whyte S.K. et al. (1989) *Cytotoxic reactions of rainbow trout, Salmo gairdneri Richardson, macrophages for larvae of the eye fluke Diplostomum spathaceum (Digenea)*. J. Fish Biol., 35, 333-45.
- 41) Galcotti M. et al. (1995) *Comparison of antigen and mitogen induced in vitro stimulation of lymphoid cells from various organs of sea bass (D. labrax)*. In pubblicazione su "Bulletin of the European Association of fish pathologists".

# PATOLOGIA PARASSITARIA DEI PESCI

ARRU E., GARIPPA G.

*Istituto di Ispezione degli Alimenti di Origine Animale e  
Cattedra di Malattie Parassitarie degli Animali Domestici, Sassari*

L'affermarsi dell'acquacoltura ha consentito di intraprendere uno studio globale sulle parassitosi dei pesci. Le indagini fin qui espletate hanno evidenziato diverse analogie con le parassitosi dei mammiferi ma anche qualche difformità specialmente nel campo della patologia. In questa nota ci limitiamo a presentare le principali caratteristiche biopatologiche dei parassiti e a descrivere alcuni quadri istologici ottenuti in prevalenza da pesci provenienti dalle acque della Sardegna.

**CROSTACEI.** Sono numerosissimi e tutti ectoparassiti ad eccezione di quelli appartenenti alla famiglia *Philichthyidae*. Hanno uno sviluppo esogeno diretto, molto rapido. Le forme parassitarie sono rappresentate soprattutto da femmine adulte.

Esistono molti dati sulla patologia dei crostacei: alimentandosi di sangue o di cellule epiteliali distruggono tessuti e organi, principalmente cute e branchie, ma anche muscoli, occhi, reni, fegato, intestino e scheletro. Provocano generalmente necrosi dei tessuti infestati e ne alterano le funzioni. I pesci colpiti presentano anemia, debolezza, riduzione del peso, ritardo nella crescita, malformazione e ridotta potenzialità riproduttiva. Spesso le lesioni aprono la porta a infezioni secondarie da funghi e da protozoi. Le infestazioni dei crostacei sono fortemente condizionate da fattori abiotici.

Infestazioni massive con elevata mortalità da Copepodi del genere *Ergasilus* e *Lernaea* sono state osservate nei ciprinidi. Meno gravi le lesioni cutanee da *Prothocandracanthoides angustatus* nel pesce prete (*Uranoscopus scaber*), da *Elythrophora brachyptera* nelle branchie di tonno (*Thunnus thynnus*) e da *Lernanthropus gisleri* nella spigola (*Dicentrarchus labrax*).

Con una certa frequenza sono stati riscontrati Isopodi del genere *Livoneca* nella cute di ghiozzi (*Gobius* spp.) e nelle branchie di aguglia (*Belone belone*).

Importante infine il reperto di Branchiuri del genere *Argulus*. Conosciuti come pidocchi dei pesci si fissano sulla cute mediante ganci e ventose e quindi vi infiggono la proboscide che funge da organo nutritivo.

Istologicamente nei pesci infestati da crostacei si osservano microemorragie, infiltrazione parvicellulare e necrosi.

**PROTOZOI.** Si riscontrano in tutti gli stadi di vita dei pesci. Alcuni sono ectocommensali ma quando si sviluppano in numero elevato possono interferire sulla funzionalità cutanea e branchiale. Altri sono parassiti obbligati della pelle e dell'epitelio branchiale, della muscolatura scheletrica e cardiaca, dell'intestino, del fegato, dei reni, della vescica natatoria, dei testicoli e perfino del sangue e possono provocare malattie acute e morte. Diversi protozoi sono conosciuti da lungo tempo, altri sono stati studiati in tempi recenti.

**APICOMPLEXA.** I coccidi dei pesci appartengono al genere *Eimeria*. Sono segnalate infezioni massive da *E. gadi* a carico della vescica natatoria, specialmente in *Gadus aeglefinus*, con compromissione della locomozione e della ovodeposizione (Odense e Logan, 1976); da *E. sardinae* con distruzione della struttura testicolare e castrazione nella sardina (Pinto, 1957).

Le infezioni dell'intestino possono provocare gravi enteriti a carattere distruttivo spesso incompatibili con la vita (Solangi e Overstreet, 1980), ma anche modica distruzione dell'epitelio come quelle riscontrate in anguille allo stato libero.

**MIXOZOA.** Sono considerati tra i parassiti più importanti sotto il profilo economico essendo spesso responsabili di malattie a carattere degenerativo che solo raramente causano mortalità. Fanno eccezione le infezioni da *Mixidium spp.* che provocano ulcere cutanee ad esito mortale nelle anguille allevate (Usui, 1974).

*Mixobolus pfeifferi* colpisce barbi, carpe, ecc. soprattutto in estate, con sviluppo di cisti di aspetto tumorale circondate da reazione connettivale. Le cisti contengono migliaia di spore. I pesci si muovono lentamente, presentano turbe dell'equilibrio e muoiono. Le carni assumono aspetto giallastro e si decompongono rapidamente per effetto dei fenomeni di miolisi.

L'infezione branchiale da *M. exigus* è stata ritenuta responsabile di una grave epizoozia con elevata mortalità verificatasi nel 1949 nei cefali (*Mugil cephalus*) del Mar Nero (Shulman, 1957). La morte è stata attribuita ad asfis-

sia conseguente ai danni tissutali, alle estese emorragie e alla distruzione delle lamelle branchiali.

*M. aeglefini* invade la cartilagine di *Pleuronectes platessa* del mare del Nord causandone la morte (Møllergaard e Nielsen 1984, 1985), mentre *M. ciprini* è l'agente dell'anemia perniciosa delle carpe. Localizzandosi nelle branchie provoca emorragie, necrosi e morte.

Di discreta gravità risultano le lesioni da *Mixobolus pfeifferi* osservate nelle branchie, occhio e fegato di cefali in Sardegna.

*Myxosoma cerebralis* è tra i protozoi più importanti. Le forme giovanili invadono la cartilagine cranica dei salmoni intorno alla capsula uditiva e se ne nutrono causando deformità. I pesci colpiti presentano alterazione dell'equilibrio con movimenti a spirale (lentosporiasi). Col progredire della malattia si registra la deformazione della colonna vertebrale e alterazioni della pigmentazione. Nelle trote la mortalità è elevata (100%) mentre gli adulti diventano portatori sani e rappresentano un pericolo per la diffusione della malattia.

*Kudoa histolytica* colpisce sgombri, merluzzi e salmoni. Secerne un enzima proteolitico che determina la degenerazione totale del muscolo e la morte. I pesci infestati manifestano turbe locomotorie. I muscoli hanno aspetto lattiginoso e sono così rammolliti da non poter essere tagliati perché liquefatti. Le zone parassitate assumono aspetto fluorescente alla luce di Wood.

*Kudoa thyrstitis* è responsabile di gravi morie di salmoni atlantici allevati in gabbia (Havel e Scott, 1985). In Giappone sono state segnalate almeno 4 specie di *Kudoa* in *Seriola quinqueradiata* (yellowtail) (Egusa e Shionitsu, 1983).

*Kudoa clupeiidae* si riscontra spesso sotto forma di noduli cistici in filetti di merluzzo congelati provenienti dall'Argentina dove è stato trovato il protozoo ancora vivo e vitale.

**CILJOPHORA.** Sono da ricordare in primo luogo *Trichodina* sp. presenti come ectoparassiti nei pesci d'acqua dolce ma soprattutto nei pesci di mare allevati. Un importante parassita di questo Phylum è *Ichthyophthirius multifiliis*, cosmopolita, causa di notevoli danni nei pesci d'acqua dolce. Attacca il tegumento, le pinne e le branchie dove si osservano noduli biancastri che provocano erosioni epiteliali e ispessimento. Quando le cisti si rompono i protozoi passano nell'acqua dove si dividono producendo fino a 2000 tomiti. *I. multifiliis* produce spesso gravi infezioni in pesci d'acquario.

**PROTOZOA.** Dei protozoi ematici meritano un cenno i tripanosomi,

veicolati da sanguisughe. Molto più diffuso è *Ichthyobodo* (Costia) *necatrix*, cosmopolita, agente di gravi perdite in tutti i pesci d'acqua dolce. Questo protozoo penetra nelle cellule epiteliali servendosi di un uncino; si riproduce sulla superficie del corpo generando necrosi delle cellule epidermiche, prurito e ipersecrezione. Negli allevamenti di salmonidi sono particolarmente sensibili gli avannotti che muoiono per congestione branchiale. La cute può presentare chiazze grigie da sfregamento.

## ELMINTI

**TREMATODI MONOGENEI.** Sono ectoparassiti generalmente privi di ospiti intermedi. Di piccole dimensioni, possiedono un organo di fissazione posteriore (haptor) armato di ganci e/o ventose e uno anteriore. L'haptor è unico, ha 2 paia di uncini grandi (ancore) e 12-16 gancetti laterali nei *Monopisthocotylea*; è invece più sviluppato e provvisto di tenaglie nei *Polyopisthocotylea*.

Producono oncomiracidi che si fissano all'ospite ad eccezione dei Girodattili, vivipari, che danno vita a nuovi individui identici agli adulti e forse infestano gli altri pesci per contatto.

I monogenei *Gyrodactylus* e *Gyrodactyloides* sono presenti negli allevamenti di acqua dolce e marina e si localizzano su pelle, branchie e pinne. Sono specie-specifici e si riproducono con estrema facilità. La loro presenza in forma epizootica è segno di cattiva conduzione degli allevamenti ed è talvolta associata a protozoi. Nei pesci delle acque sarde sono stati segnalati *Gyrodactylus* e *Gyrodactyloides* spp, compreso *Lamellodiscus elegans* nei cefali, *Dactylogirus* sp. nei ciprinidi, *Metamicrocotyla cephalus* nei muggini, *Atrispinum mormyri* nella mormora, *Anthocotyle merluci* nel merluzzo e *Hexostoma thynni* nel tonno.

La presenza di questi parassiti ha sempre provocato accentuate lesioni traumatiche a carico delle branchie.

**TREMATODI DIGENEI.** Alcuni digenei hanno ciclo biologico che si svolge nei molluschi (1° ospite intermedio), nei pesci (2° o.i.) e in altri pesci e/o uccelli predatori (ospiti definitivi). Nei pesci le metacercarie si localizzano in diversi distretti dell'organismo. Le infestazioni massive provocano gravi danni e perfino morte (Kinne, 1984).

**DIGENEI ADULTI.** Oltre che numerosi, i digenei dei pesci si localizzano

in sedi diverse. La più frequente è l'intestino dove sono presenti: *Bucephalus polymorphus* nell'anguilla; *Haplospalchnus pachysomus* Schikhobalotrema sp., *Haploporus benedeni*, *Saccocoelium obesum* e *Dicrogaster contractus* nei muggini, *Cainocreadium labracis* e *Timoniella praeteritum* nella spigola; *Crepidostomum farionis* nella trota; *Opecoeloides furcatus* nella triglia, *Helicometra pulchella* nel capone.

Di norma questi parassiti determinano con la loro armatura spinosa fenomeni di enterite con disepitelizzazione particolarmente marcata nei punti della mucosa dove si fissano.

Nel sottocute di pesce spada sono rinvenibili cisti di 1-3 mm delimitate da una spessa parete connettivale contenenti *Didymocystis xiphiados*. Al taglio defluisce spontaneamente materiale bianco giallastro che lascia intravedere la porzione cefalica del trematode. All'esame istologico si evidenziano le uova e un quadro reattivo perifocale costituito da connettivo lamellare infiltrato da numerose cellule.

Nelle branchie di tonno (*Thunnus thynnus*) si osservano invece cisti ovalari di colorito grigiastro contenenti *Didymocystis wedliis* già segnalato nel Mediterraneo (Ariola, 1902).

**DIGENEI LARVE.** In passato sono state descritte le metacercarie di *Stephanostomum cesticillus* prelevate dal sottocute e da altre parti del corpo di triglie (*Mullus barbatus* e *M. surmuletus*) e individuato il parassita adulto nella rana pescatrice (*Lophius piscatorius*).

Uno studio condotto sulle metacercarie di *Phagicola italica* e di *Heterophyes heterophyes* dei muggini ha consentito di rilevare lesioni istologiche caratterizzate da atrofia delle fibre muscolari, degenerazione granulare e lieve infiltrazione linfoplasmocitaria.

Di facile riscontro è la metacercaria di *Diplostomum spathaceum* negli occhi dei pesci di acqua dolce.

**CESTODI.** Ne sono stati descritti un migliaio. I pesci possono fungere sia da ospiti intermedi che definitivi. Le infestazioni più dannose sono quelle massive che colpiscono i pesci giovani. Alcuni cestodi non erano presenti in Europa (*Caryophyllaeus*, *Khawia*, *Triaenophorus* spp.) ma sono stati importati negli ultimi anni.

La cestodiasi più comune è la botriocefalosi intestinale da *B. acheilognathi* che può causare enterite, ostruzione intestinale e tossicosi. Altri botriocefali infestano sia i pesci d'acqua dolce che marina. Nelle acque della

Sardegna sono presenti *Bothriocephalus* sp. nel merluzzo e *B. vallei* nella triglia e altri cestodi non classificati nella ricciola (*Seriola dumerilii*).

L'infestazione da larve di botriocefali più conosciuta è quella sostenuta da *D. latum*. Comune è però anche l'infestazione massiva di tinche da larve di *Ligula intestinalis* che provocano peritonite o ascite da compressione. Frequente è inoltre il reperto di larve plerocercoidi di *Molicola horridus* nei muscoli di pesce imperatore (*Luvarus imperialis*) e nei muscoli e nel fegato di pesce luna (*Mola mola*). La larva determina compressione e distruzione delle fibre muscolari con focolai di necrosi ricchi di elementi figurati negli spazi interfibrillari. Nel pesce luna il parenchima epatico appare pluriconcamerato e atrofico e il tessuto residuo in stato di sofferenza. Singolare è infine il riscontro di larve plerocercoidi di *Grillotia epinepheli* sp.n. nella cernia (*Epinephelus guaza*). Le cisti, localizzate nel peritoneo viscerale e nello spessore della parete dello stomaco, presentano colorito grigio tendente al marrone. Istologicamente appaiono situate dentro i vasi mesenterici il cui endotelio mostra fenomeni degenerativi. I restanti vasi presentano invece solo uno stato congestizio.

**NEMATODI.** Benché riscontrabili in numero elevato sia allo stato adulto che larvale sono i parassiti meno studiati. Ai nematodi adulti localizzati nell'intestino si attribuisce perciò un limitato potere patogeno quantunque in alcuni casi siano state notate gravi enteriti e perfino peritoniti. I più noti sono quelli della superfamiglia *Ascaridoidea* (*Hysterhophylacium* sp. in *Sargus annularis*, ecc) che per le grandi dimensioni è facile osservare in diverse specie ittiche predatrici. Va ricordato il reperto di *Cucullanus* sp. nell'intestino di muggini e di *Philometra* sp. nella tracina (*Trachinus draco*). Questo parassita è stato segnalato in molte popolazioni di pesci in libertà e costituisce un problema negli allevamenti di carpe. In Sardegna si osserva anche la presenza di *Anguillicola crassus* nella vescica natatoria di anguille allo stato libero. Parassita ematofago svolge azione spoliatrice che lede la parete vescicale alterando la stabilità del pesce. Le infestazioni gravi provocano perdite economiche: nelle anguille colpite si registra anoressia e alterazione nell'indice di conversione degli alimenti. La parete della vescica natatoria appare ispessita, opaca e contiene sangue parzialmente digerito. Le infestazioni pauciparassitarie non modificano la funzionalità vescicale la cui parete rimane trasparente e consente di vedere i nematodi dall'esterno.

Particolare importanza ha assunto in questi anni il riscontro di larve di *Anisakidi* che costituiscono un pericolo nei confronti della salute dell'uomo.

**ACANTOCEFALI.** Impiantandosi con la proboscide nella mucosa intestinale causano enteriti traumatiche, emorragie, perforazione intestinale. I pesci infestati presentano anemia, scarso incremento ponderale, magrezza, cachessia ed anche morte. Istologicamente si osserva distruzione dell'epitelio nel punto di infissione della proboscide, reazione connettivale e infiltrazione leucocitaria nel tessuto circostante. Alcune specie perforano l'intestino e ledono il fegato. Infestioni massive da *Neochinorhynchus* e *Floridosentis spp.* sono state osservate nei muggini, da *Rhadinorhynchus pristis* negli sgombri e da altre specie ancora non classificate nelle triglie.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Arru E., Deiana S., Ceretto F. - *Infestione sottoepidermica da forme larvali di Trematodi appartenenti al genere Stephanostomum (Loos, 1889) nelle triglie pescate nel Mediterraneo.* Nota 1°: Morfologia, Biologia e Patologia. Riv. It. Piscic. Ittiopat. 3, (4) 82-85, 1968.
- 2) Arru E., Lconi A., Garippa G. - *Contributo alla conoscenza della parassitofauna dei pesci delle acque costiere ed interne della Sardegna.* Parassitologia, 30 (Suppl. 1) 14-16, 1988.
- 3) Arru E., Sanna E., Cuzzupoli G.F. - *Metamicrocotyla cephalus (Monogenea) in Mugil cephalus.* Parassitologia, 30 (Suppl. 1) 17-18, 1988.
- 4) Arru E., Garippa G., Sanna E. - *Molicola horridua (Goodsir, 1841) in Luvarus imperialis e in Mola mola.* Boll. Soc. It. Pat. Ittica, 5, 92-96, 1991.
- 5) Arru E., Garippa G., Sanna M.L. - *I parassiti dei mugilidi delle acque salmastre della Sardegna.* Biologia Marina Mediterranea 2 (1), 1995 (in stampa).
- 6) Canestri Trotti G., Cappellaro H., Fioravanti M.L., Restani R. - *Segnalazione di Eimeria variabilis e Imeria anguillae in anguille (Anguilla anguilla) di vallicoltura e di importazione in Italia Settentrionale.* Boll. Soc. It. Pat. Ittica, 3, 8-12, 1990.
- 7) Ceretto F., Arru E. - *Infestione sottoepidermica da forme larvali di Trematodi appartenenti al genere Stephanostomum (Loos, 1889) nelle triglie pescate nel Mediterraneo.* Nota 2° Caratteri organolettici, vitalità delle larve e considerazioni ispettive. Riv. It. Piscic. Ittiopat., 4, (1) 23-26, 1969.
- 8) Di Cave D., Lo Giudice P., Orecchia P., Paggi L. - *Sulla presenza di Gyrodactylus sp. in Liza ramada del Lago di Sabaudia.*
- 9) Fioravanti M.L., Restani R. - *Osservazioni sullo sviluppo larvale di Anguillicola crassus (Nematoda, Anguillicolidae) in Diacyclops bicuspidatus (Copepoda, Cyclopidae).* Boll. Soc. It. Pat. Ittica, 8, 34-43, 1992.
- 10) Garippa G., Sanna E., Cuzzupoli P. - *Segnalazione di Aaplospianchnus spachygomug in Mugil cephalus dello stagno di "Is Benas" (Prov. di Oristano).* Parassitologia, 30 (Suppl. 1), 77-78, 1988.
- 11) Garippa G., Sanna E. - *Anguillicola crassus in Anguilla anguilla della Sardegna.* Boll. Soc. It. Pat. Ittica, 2, 3, 5, 1988.

- 12) Garippa G., Sanna E., Scala A. - *Skriabinus guevrai* (Nematoda, Pseudaliidae) e *Synthesium sturcionig* (Trematoda, Dienea) in *Tursiops truncatus*. Boll. Soc. It. Patologia Ittica, 5, 57-100, 1991.
- 13) Garippa G., Delogu E., Sanna M.L., Madeddu S. - *Presenza di larve di Anisakidi in specie ittiche della Sardegna*. Boll. Soc. It. Pat. Ittica, 5, 1983.
- 14) Garippa G., Sanna M.L., Delogu E. - *Kudoa sp.* (Protozoa-Myxogporidia) in *Merluzzi di importazione*. Boll. Soc. It. Pat. Ittica, 5 (11), 64-68, 1993.
- 15) Ghittino P. - *Tecnologia e Patologia in Acquacoltura. Vol. 2 Patologia*. Ed. E. Bono, Torino, 1985.
- 16) Kabata Z. - *Parasitic Copepoda of British Fishes*. London, Ray Society, 1975.
- 17) Leoni A., Piras P.L., Siddi M.R. - *Oidymocygtig xyphiados* in *Xiphias gladius* del Mediterraneo. Parassitologia 30 (Suppl. 1) 107-108, 1988.
- 18) Paggi L., Orecchia P., Catalini N., Di Cave D. - *Indagine sulla parassitofauna delle specie ittiche eurialine di interesse commerciale: aspetti patologici*. Atti Sem. Unita Op. piano Pesca e Acquacoltura. IV°, 1927-1940, 1988.
- 19) Ronald J. Roberts - *Fish Pathology*. Ed. Baillière Tindall, London, 1978.
- 20) Sanna E., Garippa G. - *Bacacoelium, Haploporus e Dicrosaster spp.* in *Mugil cephalus* della Sardegna. Boll. Soc. It. Pat. Ittica, 2, 6-10, 1985.
- 21) Scala A., Garippa G. - *La Myxosporidiosi in Mugil auratus e Mugil cephalus della laguna del Calich (Alghero-SS)*. Atti S.I.S.Vet., 44, 1255-1262, 1990.
- 22) Scala A., Garippa G., Tilocca V. - *Trhypanorinchidae cistidea in una cernia (Epinephelus suaza) della costa Nord-orientale della Sardegna*. Boll. Soc. It. Pat. Ittica, 7, 1-6, 1991.
- 23) Scala A., Garippa G., Sanna E. - *Heterophidi e mixosporidi nei muggini del Calich (Alghero-Sassari)*. Boll. Soc. It. Pat. Ittica, 5, 88-91, 1991.
- 24) Scholz T., Garippa G., Scala A. - *Grillotia epinepheli sp.n. (Cestoda: Trhypanorhincha) plerocerci from the teleost, pinephelus uaza in Sardinia, Italy*. Folia Parassitologica, 40, 23-28, 1993.
- 25) Sebastio C. - *Igiene e Controllo Sanitario dei prodotti della pesca*. Ed. Impremare, Taranto, 1989.

# LE NEOPLASIE NEI TELEOSTEI

BIAVATI S., MANERA M.

*Istituto di Patologia Generale e Anatomia Patologica Veterinaria, Bologna*

## RIASSUNTO

Pur vantando citazioni bibliografiche a partire dalla fine dell'800, un razionale, sistematico e sperimentale studio delle neoplasie dei teleostei è una recente acquisizione. Sebbene le neoplasie dei teleostei presentino aspetti che sembrano essere caratteristica comune delle neoplasie dei vertebrati (progressione secondo una modalità multi-steps) le peculiarità istologiche e fisiologiche dei teleostei non permettono una semplicistica proiezione dei dati sulle neoplasie ottenute dai mammiferi. La classificazione dei tumori dei mammiferi basata su riscontri morfologici trova riscontro nei teleostei; non lo trovano le classificazioni basate su valutazioni clinico-prognostiche o su particolari *marker*. Lo studio delle neoplasie dei teleostei può essere d'ausilio nella valutazione del degrado degli ecosistemi acquatici e nella ricerca dei meccanismi patogenetici della patologia neoplastica.

## SUMMARY

Neoplasms in teleosts were described since the end of the nineteenth century but only recently they were rationally, systematically, experimentally studied. The multi-steps neoplastic progression mode is demonstrated in some fishes, in any case fishes neoplasms display other features that prevent the simple extension of mammalian neoplasm data on teleosts. Only the morphological mammalian neoplasms classification can be used to classify teleosts neoplasm. Fishes neoplasms could be used as *biomarkers* or as experimental model.

Diverse sono le forme neoplastiche dei teleostei riportate in letteratura e sovrapponibili a quelle degli altri vertebrati sono le cause carcinogenetiche. In riferimento agli elasmobranchi (pesci cartilaginei) viene ancora oggi riportato da fonti giornalistiche a caccia di *scoop*, e di sicuro lontane dalla

patologia comparata, che siano esenti da forme neoplastiche. Stoskopf (1992) ritiene che questo fraintendimento non sia dovuto all'assenza di neoplasie descritte in letteratura per questi organismi che risalgono ai primi del '900 - bensì ad una alquanto fuorviante interpretazione di alcuni dati sul tessuto che caratterizza questi animali, il tessuto cartilagineo. Accadde, infatti, che nel corso di studi volti a valutare l'impiego della cartilagine degli elasmobranchi in sostituzione di quella di vitelli in accrescimento, venissero evidenziati fattori inibenti la vascolarizzazione all'interno della stessa cartilagine (Lee e Langer, 1983). Un analogo fattore, sebbene a titoli inferiori, è stato anche isolato dalla cartilagine bovina (Lee e Langer, 1983). I ricercatori in considerazione della rarità dei casi di neoplasie hanno voluto relazionarlo a questo fattore che renderebbe questi animali "resistenti" alla patologia neoplastica, colpendola in un punto critico, quello della vascolarizzazione. Tuttavia, oltre al fatto che sono stati descritti anche tumori maligni, la scarsità di casi di neoplasie descritte in letteratura è da imputarsi a scarso e superficiale interesse scientifico nei confronti degli elasmobranchi, se paragonato a quello prestato ai teleostei di interesse commerciale e non tanto ad una scarsa incidenza in questi organismi (Stoskopf, 1992).

Fin ad ora sono stati studiati casi di tumori, comparsi con una certa frequenza, in pesci commestibili, di acquario oppure in soggetti presenti in acque interne ad alto rischio di inquinamento per la presenza di industrie ma le descrizioni istopatologiche sono di norma carenti o condotte senza criterio anatomopatologico, anche se esistono meritevoli eccezioni, purtroppo non sufficientemente divulgate. Nei teleostei sono state anche condotte prove sperimentali di carcinogenesi, volte a saggiare il potenziale carcinogenetico di varie sostanze sui pesci e la modalità di crescita neoplastica (Ashley, 1969, Hayes e Ferguson, 1989). Il lavoro sperimentale serve in quanto i pesci viventi in acque inquinate possono essere dei validi indicatori biologici pronti a segnalare la presenza di agenti ambientali carcinogenetici. Si potrebbe avere una precoce indicazione atta ad impedire il rischio per altri vertebrati, uomo compreso, allorchè si riuscisse a correlare il danno neoplastico con la concentrazione della sostanza carcinogenetica, utilizzando, in tal modo, le neoplasie dei teleostei come *biomarkers*. La patologia comparata insegna, inoltre, come dati desunti da una specie possano essere proiettati in un'altra, senza scendere in semplicistiche trasposizioni che non tengano conto delle diverse biologie degli organismi comparati. Il fenomeno neoplastico è un interessante fenomeno biologico cellulare che presenta aspetti comuni a specie filogeneticamente molto distanti tra loro.

## PROGRESSIONE NEOPLASTICA

La patogenesi neoplastica multi-steps è stata dimostrata in molti vertebrati terrestri ed anche, sebbene in minor misura, in alcuni teleostei. Le neoplasie posseggono una propria storia naturale, conosciuta oppure no, la quale consta di alcuni eventi in successione indispensabili per l'insorgenza della neoplasia stessa:

Iniziazione, Promozione (preceduta o meno da un periodo più o meno lungo di latenza), Conversione, Progressione (Hayes e Ferguson, 1989).

Nello stadio di iniziazione i carcinogeni di tipo chimico, fisico, biologico agiscono sulla cellula normale nel senso di determinare lesioni permanenti al DNA consistenti in mutazioni geniche od attivazione degli oncogeni. I virus a DNA o RNA - copia di DNA creata dalla trascrittasi inversa - possono integrarsi col patrimonio genetico della cellula ospite alterandone in varia misura le sue potenzialità geniche che vengono trasmesse alla progenie all'atto della mitosi. Sono diverse le neoplasie dei vertebrati sicuramente indotte da virus (Si veda oltre).

Può seguire uno stadio di latenza durante il quale l'alterazione al patrimonio genetico, qualunque essa sia, rimane quiescente, non esprimendosi fino a che non subentri uno stimolo che promuova la crescita e moltiplicazione cellulare, dando modo alla mutazione od all'oncogene di esprimersi.

Nello stadio della promozione le cellule iniziate subiscono uno stimolo alla crescita ed alla moltiplicazione ad opera di sostanze coadiuvanti, che inducono una sorta di selezione preferenziale alla proliferazione nei confronti delle cellule neoplastiche. Nel corso della fase di promozione è ancora possibile la regressione del fenomeno in atto con scomparsa o ridifferenziazione delle cellule neoplastiche.

L'espressione della mutazione genica o dell'oncogene, con la vera e propria trasformazione in cellula neoplastica, atipica e non più soggetta ai segnali di controllo dell'organismo si ha nel corso della fase di conversione. Si assiste ad una crescita espansiva. In questa fase la "potenzialità" neoplastica diviene attuale, viene espressa.

Nello stadio della progressione si assiste a tutta una serie di epifenomeni conseguenti alla trasformazione neoplastica ed alla mancanza di controllo della cellula neoplastica, rappresentati da alterazioni cromosomiche e marcate atipie morfologiche, in passato fin troppo sopravvalutate. Possono subentrare ulteriori mutazioni geniche che danno origine a cloni cellulari sempre più invasivi, maligni ed è in questo con-

testo che l'organismo<sup>1</sup> o la terapia possono favorire, loro malgrado, la progressione neoplastica, mettendo in atto una vera e propria pressione selettiva sulle cellule neoplastiche.

Le neoplasie maligne dei teleostei manifestano la loro malignità per crescita espansiva, infiltrativa e raramente metastatizzano. Il perchè non si assista, se non di rado, al fenomeno della metastasi non è noto e potrebbe dipendere da carenza di fattori enzimatici e di membrana o da una differente sorveglianza immunitaria nei teleostei.

### CLASSIFICAZIONE DEI TUMORI NEI TELEOSTEI

Le classificazioni note in patologia veterinaria e umana, peraltro in continuo aggiornamento alla luce delle nuove acquisizioni, sono troppo complesse per estenderle a comprendere i tumori dei teleostei perchè considerano le lesioni neoplastiche in proiezione prognostica e terapeutica valutando, quindi, il *grading* e lo *staging* tumorale. E' noto, infatti, di come spesso la malignità clinica non corrisponda alla malignità istopatologica.

Nei pesci lo studio dei tumori è interessante soprattutto per cercare di chiarire il meccanismo patogenetico e le eventuali interazioni esercitate da agenti inducenti, coadiuvanti, promuoventi di ogni tipo sulla storia naturale del tumore. Lo studio assume quindi importanza nella carcinogenesi sperimentale con l'intento di creare modelli noti che potrebbero essere impiegati nella prevenzione (monitoraggio ambientale, acquacoltura, difesa del territorio) e potrebbero rivelare sostanze cancerogene nocive per l'uomo e gli animali domestici.

La conoscenza del *grading* e *staging* hanno solo fini prognostici per indicare i protocolli terapeutici e, quindi, sono di massima utilità per l'uomo e gli animali domestici. Per dette ragioni, in accordo con Mawdesley-Thomas (1975), proponiamo di continuare ad adottare per i tumori dei Teleostei la classificazione proposta da Willis (1967). Hayes e Ferguson (1989) rimandano, invece, al Moulton (1978):

---

1) Di norma la cellula neoplastica, allorchè esprime i caratteri fenotipici della neoplasia, cioè esprime l'oncogene od il segmento mutato di DNA, perde o può perdere i caratteri di *self* e viene riconosciuta estranea dall'organismo, comportandosi metabolicamente ed immunologicamente come un vero e proprio parassita. In tal senso la cellula neoplastica si trova in un ambiente, rappresentato dall'organismo ospite, a lei ostile e, pertanto, sottoposta a continue pressioni selettive che possono favorire la selezione di cloni sempre più adattativi, invasivi. In proposito è interessante notare come la terapia antineoplastica con farmaci che "accecano" i recettori per gli estrogeni nelle forme adenocarcinomatose mammarie umane possa, in alcuni casi, sottoponendo la popolazione cellulare neoplastica ad una vera e propria pressione selettiva, favorire la comparsa di cloni neoplastici estrogeno-indipendenti.

Tumori del tessuto epiteliale	Papillomi, papillomatosi, adenomi, carcinomi.
Tumore del tessuto mesenchimale non emopoietico	Fibromi, lipomi, condromi, osteomi, angiomi, raddomiomi, leiomiomi, mixomi, fibromixomi e vari tipi di sarcomi (ad es.: fibrosarcomi).
Tumori del tessuto emopoietico	Linfomi, linfosarcomi ed altri tumori del tessuto emopoietico.
Tumori del tessuto nervoso	Neurilemmomi, ganglioneuromi, schwannomi ed altri tumori derivanti dal sistema nervoso centrale o periferico
Tumori particolari	Melanomi, eritroforoma, xantoforoma, guanoforoma da cellule derivanti dalle creste neurali. Teratomi ed altri tumori embrionali derivanti da germi embrionali.

(Modificata da Willis, 1967 e da Mawdesley-Thomas, 1975)

*TUMORI DEI TELESOTEI SPERIMENTALMENTE INDOTTI (Da Ashley L.M., 1969)*

Probabilmente l'inizio della carcinogenesi sperimentale nei teleostei risale agli storici esperimenti di Marine e Lenhart (1910) sugli effetti della carenza di iodio sulla tiroide dei pesci che cominciarono a focalizzare l'attenzione dei ricercatori sulla necessità di considerare attentamente le differenze anatomiche tra vertebrati al fine di non incorrere in errori interpretativi proiettando semplicisticamente sui pesci i dati dedotti dai mammiferi. Weisseberg (1939-1945) studiando la linfocisti ipotizzò per primo una eziologia virale per questa particolare patologia neoplastica dei teleostei. Weisseberg scoprì che le cellule linfocistiche erano in realtà dei fibroblasti ipertrofici. E' ora noto che il virus agente eziologico della linfocisti induce i fibroblasti ad ingrandirsi, impedendone nel contempo la mitosi. Si tratta sempre e comunque di un difettoso controllo della crescita cellulare, per ipertrofia, nello specifico caso, piuttosto che per iperplasia, come nelle co-

muni neoplasie Lo stesso autore (1911) scoprì l'interessante fenomeno degli 'xenomi' o complessi xeno-parassitari studiando larve di pesci sperimentalmente infettate ed uccise ad intervalli periodici. Un microsporidio (*Glugea* spp.) parassita intracellulare induce le cellule mesenchimali da esso infettate all'ipertrofia ed alla divisione nucleare amitotica. Anche in questo caso valgono le medesime considerazioni fatte per la linfocisti. Notevole interesse destò la scoperta di neoplasie geneticamente indotte e determinate dai geni che controllano la pigmentazione allorchè Kosswig (192g), Reed e Gordon (1931) e Nigrelli et al. (1951) descrissero un tumore pigmentato negli ibridi ottenuti dall'incrocio di *Xiphophorus helleri* X *Platypoecilus maculatus*. Recentemente è stato scoperto un oncogene virale (virogene) in pesci del genere *Xiphophorus*, una sorta di equivalente ittico del virogene del sarcoma aviare ma si ignora il loro rapporto con la neoplasia. Li e Baldwin (1944) indussero involontariamente tumori testicolari (sarcomi) in *Xiphophorus helleri* iniettando "retroperitonealmente" ormoni lipo-solubili veicolati da olio di sesamo. Epizozie mondiali di carcinomi epatici in trote d'allevamento diedero un notevole impulso alla carcinogenesi sperimentale nei pesci. Negli U.S.A. furono saggiate tredici diete carcinogenetiche per topi da laboratorio ed undici lo risultarono anche per le trote (Dimetilnitrosamina, acetilaminofluorene, ecc...). Si scoprì in seguito che la causa dell'epizozia era da attribuirsi all'aflatossina - in particolare la B1 - prodotta da *Aspergillus flavus*, muffa contaminante il mangime. La trota è tra gli animali più sensibili a questa tossina prestandosi bene come *biomarker*. Furono proprio le ricerche sulla cancerogenicità per la trota elemento di impulso allo studio della cancerogenicità da micotossine in altre specie, compresa quella umana. Da uova di diverse specie ittiche sperimentalmente trattate con 13-amino-propionitrile ad opera di Levy (1962) nacquero larve con un caratteristico tumore della notocorda (eccordoma).

Questo breve *escursus* storico è stato inserito per sottolineare l'importanza dell'impiego dei teleostei come modelli di ricerca e di come diverse acquisizioni sulla patologia dei teleostei si siano riflessi, in seguito, in altre specie animali, uomo compreso.

### CARATTERIZZAZIONE ISTOGENETICA E FENOTIPICA.

Gli studi di morfopatologia e i tests per la specificità dei differenti caratteri istologici delle cellule, aiutano a identificare le derivazioni embriologiche degli elementi neoplastici anaplastici ed in modo particolare in organi sede di metastasi. La ricerca però non è attendibile se condotta nei tumori in stadi

di marcata anaplasia perchè durante la perdita della differenziazione le cellule possono aver perduto i propri caratteri - tutte quelle strutture proteiche, glicoproteiche, citoplasmatiche o di membrana caratterizzabili istochimicamente ed immunoistochimicamente per ogni tipo cellulare - oppure possono esprimere nuove proteine o glicoproteine non espresse nelle cellule da cui proviene il tumore (alfa-fetoproteina e antigene carcinoembrionario nei mammiferi). C'è da dire che ancora pionieristica è la ricerca di *marker*<sup>2</sup> tumorale per i teleostei e rappresenta, in gran parte, una trasposizione dei dati acquisiti in patologia umana e veterinaria. Nei teleostei sono stati utilizzati Ab contro i principali filamenti intermedi (citocheratine, desmine) e l'antigene nucleare di proliferazione cellulare (PCNA) (Manera e Biavati, 1994).

### *NEOPLASIE AD EZIOLOGIA VIRALE DEI TELEOSTEI*

L'interesse per le neoplasie ad eziologia virale è di notevole interesse, soprattutto per i risvolti medico-epidemiologici umani. Tra gli animali vi sono diversi esempi di neoplasie indotte da virus a partire dai mammiferi (linfoma di Burkitt, leucosi bovina, felina, ecc...), passando agli uccelli (leucosi aviare, malattia di Marek), ai rettili (sarcoma della vipera di Russel), agli anfibi (adenocarcinoma renale della rana o tumore di Lucké), fino ai pesci.

Queste sono le neoplasie (per completezza vengono riportate anche le iperplasie) dei teleostei indotte da virus, riportate con a fianco l'agente eziologico e la/le specie colpite:

---

2) Col termine di *marker* si intende qualsiasi struttura cellulare, di solito con carattere di Ag, che possa essere usata per marcare, contraddistinguere, in maniera più o meno certa, un tipo cellulare particolare che esprima quel dato carattere normalmente (ad es. i filamenti intermedi per identificare: cellule epiteliali, muscolari, fibroblasti, cellule endoteliali, gliali, ecc...) od in condizioni patologiche (ad es. l'alfa-fetoproteina, l'antigene carcinoembrionario CEA, ecc...). Si parla di marcatori tumorali riferendosi a quei caratteri cellulari, normali od anormali che possano essere presi come riferimento per evidenziare un tumore (ad es. ricerca del CEA nel plasma in medicina umana), classificare il tumore per derivazione cellulare, e valutarne il grado di malignità (PCNA, KI-67).

FORMA NEOPLASTICA	AGENTE EZIOLOGICO	OSPITI
iperplasia epidermica nel luccio	esocid herpesvirus 1	<i>Esox lucius</i>
iperplasia epidermica	herpesvirus vitreum	<i>Stizostedion vitreum vitreum</i>
carcinoma squamoso	rainbow smelt herpesvirus	<i>Osmerus mordax</i>
linfocisti	lymphocystic virus	almeno 125 specie
iperplasia epidermica	esox epidermal hyperplasia retrovirus	<i>Esox lucius</i> , <i>E. masquinongy</i>
linfosarcoma	esox lymphosarcoma retrovirus	<i>Esox lucius</i> , <i>E. masquinongy</i>
sarcoma	esox sarcoma retrovirus	<i>E. lucius</i>
sarcoma dermico	walleye dermal sarcoma retrovirus	<i>Osmerus mordax</i>
iperplasia epidermica	walleye discrete epidermal hyperplasia retrovirus	<i>Osmerus mordax</i>
papillomi epidermici	white sucker epidermal papilloma retrovirus	<i>Catostomus commersoni</i>
papilloma epiteliale	<i>Oncorhynchus masou</i> virus e Yaname tumor virus	<i>Oncorhynchus mykiss</i> , <i>Salvelinus namaycush</i> , <i>Oncorhynchus keta</i>
iperplasia epidermica	lake trout herpesvirus	<i>Salvelinus namaycush</i>
papilloma epidermico	atlantic salmon papilloma retrovirus	<i>Salmo salar</i>
leiomiomasarcoma del salmone atlantico	atlantic salmon fibrosarcoma retrovirus	<i>Salmo salar</i>
vaiolo della carpa	herpesvirus cyprinii	<i>Cyprinus carpio</i> , <i>Tinca tinca</i> , <i>Barbus barbus</i> , <i>Abramis brama</i> , <i>Stizostedion lucioperca</i> , <i>Leuciscus idus</i>
melanoma	<i>Xiphophorus</i> spp. hybrid melanoma papovavirus	<i>Xiphophorus</i> spp.
neuroblastoma	<i>Xiphophorus</i> spp. hybrid neuroblastoma retroviruses	<i>Xiphophorus</i> spp.
iperplasia epidermica del merluzzo atlantico	atlantic cod adenovirus	<i>Gadus morhua</i>
iperplasia epidermica della limanda	dab adenovirus	<i>Limanda limanda</i>
"smelt papillomatosis"	smelt herpesvirus	"smelt"
papilloma	gillthead sea bream papilloma-associated virus	<i>Sparus aurata</i>
papilloma epidermico	pleuronectid epidermal papilloma-associated virus	diverse specie di pleuronettidi
papilloma epidermico	stomatopapilloma-associated viruses: eel virus (Berlin), EV-1, EV-2, unnamed syncytium-forming virus	<i>Anguilla anguilla</i>

(Da A.A. V.V. in Stoskopf, 1992)

## BIBLIOGRAFIA:

- 1) Ashley L.M. (1969). *Experimental fish neoplasia*. In In fish in research (edito da Neuhaus O.W. and Halver J.E.), pp. 23-3. London. Academic Press.
- 2) Biavati S.T e Mancini L. (1967). *Un caso di fibroma in sardina *Pilchardus sardina**. Nuova Vet., 43, 11-14.
- 3) Budd J., Schroeder J.D. e Dukes K.D. (1975). *Tumors of the yellow perch*. In Pathology of Fishes (edito da Ribelin W.E. e Migaki G.), pp. 895-906. Madison U.S.A.. The University of Wisconsin Press.
- 4) Dawe C.J. e Harshbarger (1975). *Neoplasm in feral fishes: their significance to cancer research*. In Pathology of Fishes (edito da Ribelin W.E. e Migaki G.), pp. 871-894. Madison U.S.A.. The University of Wisconsin Press.
- 5) Hayes M.A. e Ferguson H.W. (1989). *Neoplasia in fish*. In *Systemic pathology of Fish. A text and Atlas of comparative tissue responses in diseases of Teleosts* (edito da Ferguson H.W.), pp. 230-247. Ames U.S.A.. Iowa State University Press.
- 6) Kosswig C. (1929). Citato da Ashley L.M. (1969).
- 7) Lee A. e Langer R. (1983). Citato da Stoskopf M.K. (1992).
- 8) Levy B.M. (1962). Citati da Ashley L.M. (1969).
- 9) Li M.H. e Haldwin F.M. (1944). Citati da Ashley L.M. (1969).
- 10) Mancra M. e Biavati S. (1994). *An immuno-histochemical technique used to demonstrate the transition form of a squamous cell carcinoma in a mirror carp, *Cyprinus carpio* L.* J. Fish Dis., 17: 93-96.
- 11) Marine D. e Lenhart C.H. (1910). Citati da Ashley L.M. (1969).
- 12) Mawdesley-Thomas L.E. (1975). *Neoplasia in fish*. In Pathology of Fishes (edito da Ribelin W.E. e Migaki G.), pp. 805-870. Madison U.S.A.. The University of Wisconsin Press
- 13) Moulton J.E. ed. (1978). *Tumors in domestic animals*. Berkeley. University of California Press.
- 14) Reed H.D. e Gordon M. (1931). Citati da Ashley L.M. (1969).
- 15) Roberts R.J. (1989). *Fish pathology*. London. Baillere Tindall.
- 16) Sindermann C.J. (1990). *Neoplastic diseases. In principal diseases of marine fish and shellfish*. Vol 1, parte III, pp. 173-199. San Diego, California. Academic Press.
- 17) Sobel H.J., Marquet E., Kallman K.D. e Corley G.J. (1975). *Melanomas in *Platy/Swordtail Hybrids**. In Pathology of Fishes (edito da Ribelin W.E. e Migaki G.), pp. 805-870. Madison U.S.A.. The University of Wisconsin Press.
- 18) Scarpelli D.G. (1969). *Comparative aspects of Neoplasia in fish and other laboratory animals*. In In fish in research (edito da Neuhaus O.W. and Halver J.E.), pp. 45-85. London. Academic Press.
- 19) Sontegard R. (1975). *Lymphosarcoma in Muskellunge (*Esox masquinongy*)*. In Pathology of Fishes (edito da Ribelin W.E. e Migaki G.), pp. 907-924. Madison U.S.A.. The University of Wisconsin Press.
- 20) Stoskopf M. (ed.) (1992). *Fish medicine*. Philadelphia. W.B. Saunders Company.
- 21) Weissenberg R. (1911-39-45). Citato da Ashley L.M. (1969).
- 22) Wellings S.R. (1969). *Environmental aspects of neoplasia in fishes*. In In fish in research (edito da Neuhaus O.W. and Halver J.E.), pp. 3-22. London. Academic Press.
- 23) Willis R.A. (1967). Citato da Mawdesley-Thomas L.E. (1975).

# STUDI ISTOCHIMICI ED IMMUNOISTOCHIMICI SULLA MALATTIA PROLIFERATIVA RENALE DEI SALMONIDI

MARIN DE MATEO M. <sup>1</sup>, ADAMS S. <sup>2</sup>, CASTAGNARO M. <sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Biologia Animal, Barcelona (SP)

<sup>2</sup>Institute of Aquaculture (Scozia)

<sup>3</sup>Dipartimento di Patologia Animale, Torino

## INTRODUZIONE

La malattia proliferativa renale (PKD) è una parassitosi sistemica dei salmonidi provocata da un protozoo mixosporidio di incerta classificazione (PKX) che colpisce in modo grave e sistematico il rene determinando una nefrite granulomatosa diffusa (1). Descritta in numerosi paesi europei ed extraeuropei (2), la PKD è responsabile di gravi perdite economiche nei paesi nei quali l'allevamento dei salmonidi è più sviluppato (3). Sebbene la diagnosi della malattia non sia difficile in relazione all'incidenza stagionale, al comportamento clinico ed alle lesioni anatomico-istopatologiche, nessuno dei metodi convenzionali di diagnosi si basa sull'utilizzo di leganti specifici del PKX. Allo scopo di migliorare gli strumenti diagnostici e di studiare le caratteristiche antigeniche del PKX sono state analizzate sezioni renali di diversi salmonidi di allevamento attraverso il metodo istochimico delle lectine e quello immunoistochimico con l'utilizzo di un anticorpo monoclonale da noi prodotto (4).

## MATERIALE E METODI

Sezioni renali ed esami per impronta effettuati su diverse specie di salmonidi (trota iridea e fario, salmoni dell'Atlantico e del Pacifico) provenienti da diversi paesi europei (Italia, Francia, Gran Bretagna, Irlanda, Spagna) e del Nord America (Stati Uniti e Canada) colpiti da PKD sono stati analizzati con diverse tecniche istochimiche ed immunoistochimiche.

Per la tecnica istochimica delle lectine sono state utilizzate undici diverse lectine biotinate (Tab. 1) (Sigma Co) ed il complesso ABC (Vector) secondo

Tabella 1 - Lectine utilizzate nello studio

Origine della lectina	Acronimo	Concentrazione d'uso ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	Zucchero specifico
<i>Arachis hypogea</i>	PNA	20	Gal-b-(1-3)GalNAc
<i>Concanavalia ensiformis</i>	Con-A	10	$\alpha$ -D-Man
<i>Dolichos biflorus</i>	DBA	20	$\alpha$ -D-GalNAc
<i>Glycine max</i>	SBA	20	D-GalNAc
<i>Griffonia simplicifolia</i>	GS-I	50	$\alpha$ -D-Gal
<i>Lens culinaris</i>	LCA	20	$\alpha$ -D-Man
<i>Lycopersicon esculentum</i>	LEA	50	GlcNAc
<i>Phytolacca americana</i>	PWM	50	GlcNAc
<i>Ricinus communis</i>	RCA-I	50	b-D-Gal
<i>Triticum vulgare</i>	WGA	50	b-GlcNAc/NeuNAc
<i>Ulex europaeus</i>	UEA-I	20	$\alpha$ -L-fucosio

Gal = Galattoso; GalNAc = N-Acetil-galattosamina; Man = Mannoso; GlcNAc = N-Acetil-glucosamina; NeuNAc = Acido acetil-neuraminico (acido sialico).

il protocollo già descritto (5).

L'utilizzo della tecnica istochimica delle lectine per gli esami su impronta abbiamo utilizzato lectine biotinate (Sigma Co) ed avidina D fluoresceinata (Vector) secondo il protocollo descritto da Hedrick e al (6).

Per lo studio immunoistochimico abbiamo utilizzato l'anticorpo Mab12 secondo la tecnica indicata da Adams et al. (7) ed un anticorpo secondario anti-topo da capra (Sigma Co.).

Infine, sia la lectina GS-I che l'anticorpo Mab12 sono stati incubati simultaneamente sulle medesime sezioni utilizzando come marcante fluorescente il complesso fluoresceina-avidina D (Vector) ed un anticorpo secondario anti-topo marcato con rodamina (Organon Tecnika), rispettivamente (8).

## **RISULTATI E DISCUSSIONE**

### *Istochimica delle lectine*

I risultati ottenuti vengono schematizzati nella Tabella 2.

Occorre innanzitutto sottolineare come il PKX presenta una positività per molti residui glicidici ad eccezione dell' $\alpha$ -L-fucosio (negatività per la lectina UEA-I). Ci sembra inoltre interessante notare come quasi tutte le lectine si leghino alle cellule secondarie (PKX-CS) con un'affinità minore rispetto a quelle primarie (PKX-CP) (Tab. 2). La conoscenza della componente

Tabella 2 - Distribuzione dei legami lectinici in reni di salmonidi affetti da PKD.

Lectina	PRX-CP	PRX-CS	Linfociti	Macrofagi	Tubuli renali
PNA	+	-	+/-	+++	+++
Con-A	+++	+	++	++	++
DBA	+/-	-	-	-	-
SBA	+/-	-	-	+/-	++
GS-I	+++	++	-	-	+++
LEA	++	+	++	+++	+++
LCA	+	-	++	+++	+++
PWM	+++	++	+++	+++	++
RCA-I	+++	+	+++	+++	+++
WGA	+	-	++	+++	+++
UEA -I	-	-	-	-	-

PKX-CP = Cellula primaria del PKX; PKX-CS = Cellule secondarie del PKX

glicidica potrebbe divenire un utile strumento per la determinazione della classificazione del parassita (9) e per la comprensione dei meccanismi patogenetici in cui sono coinvolte sostanze glicidiche (10).

L'osservazione sicuramente più interessante è rappresentata dalla quasi esclusiva specificità della lectina GS-I per le cellule del PKX. Tale specificità è presente in tutte le specie di salmonidi osservate senza riguardo alcuno alle aree di provenienza geografica. La stessa lectina riconosce il parassita negli esami rapidi per impronta permettendo così una diagnosi precisa anche quando la malattia non è clinicamente conclamata ed il basso numero dei protozoi precluderebbe una loro osservazione diretta.

Infine, il legame fra lectina PNA e le principali cellule infiammatorie (macrofagi e linfociti) potrà essere utilizzato per valutare la reazione linfo-macrofagica, responsabile secondo molti Autori della eliminazione del parassita dall'ospite (11).

#### *Tecniche immunostochimiche*

L'anticorpo monoclonale prodotto Mab12 riconosce sia le forme sporogoniche che quelle extrasporogoniche del PKX in tutte le specie di salmonidi osservate. Inoltre, analogamente a quanto osservato per la lectina GS-I (Tab. 2), il determinante antigenico contro cui reagisce l'anticorpo è presente anche sulla superficie luminale dei tubuli renali. Questo fenomeno permette di ipotizzare una identità o una stretta relazione tra recettore lectinico per la GS-I ed il determinante antigenico del Mab12.

Questa ipotesi è ulteriormente rafforzata dai dati ottenuti con la doppia marcatura: l'incubazione di sezioni di rene con PKX con la lectina GS-I impedisce il successivo legame con l'anticorpo Mab12 (8).

## CONCLUSIONI

Le tecniche utilizzate hanno permesso una più approfondita conoscenza dei glicoconiugati del PKX ed un miglioramento nello studio quantitativo e qualitativo su sezioni istologiche e negli esami rapidi per impronta delle fasi del ciclo vitale del parassita. I risultati del presente studio e le prospettive future che da esso scaturiscono possono essere così schematicamente riassunti:

1. La lectina GS-I rappresenta uno strumento specifico, economico e disponibile in commercio per diagnosi rapida, precoce e sicura della PKD nei salmonidi e permette inoltre valutazioni quantitative del protozoo .

2. La messa a punto di metodiche specifiche potrebbe risultare importante per la determinazione delle prime forme infettanti del PKX c/o delle forme nell'ospite intermedio.

3. Pur esistendo diversità quantitative fra le forme sporogoniche ed extrasporogoniche del PKX, si osserva una comunanza antigenica fra i PKX presenti in diverse zone geografiche ed infettanti diverse specie di salmonidi.

4. Esiste una identità o una stretta correlazione tra il recettore per la lectina GS-I ed il determinante antigenico dell'anticorpo Mab12.

5. Infine, la produzione di un anticorpo monoclonale specifico per il PKX potrà essere utilizzata per l'isolamento ad uno stato più puro del parassita, per una determinazione del titolo anticorpale dei pesci infetti e per la messa a punto di un vaccino.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Clifton Hadley R.S., Bucke D., Richards R.H. - *Proliferative kidney disease of salmonid fish: a review*. J. Fish. Dis., 7, 363-377, 1984.
- 2) Marin de Mateo M., Castagnaro M., Ghittino C. - *La malattia proliferativa renale nei salmonidi*. Obiett. Doc. Vet., 6, 25-30, 1992.
- 3) Hedrick R.P., MacConell, de Kinkelin P. - *Kidney disease of Salmonid fish*. Ann. Rev. Fish Dis., 277-290, 1993.
- 4) Adams A., Richards R.H., Marin de Mateo M. - *Development of monoclonal antibodies to PKX, the causative agent of proliferative kidney disease*. J. Fish Dis., 15, 515-521, 1992.

- 5) Castagnaro M., Marin de Mateo M., Ghittino C., Hedrick R.P. - *Lectin histochemistry and ultrastructure of rainbow trout *Onchorhynchus mykiss* kidneys affected by proliferative kidney disease*. Dis. Aquat. Org., 10, 173-183, 1991.
- 6) Hedrick R.P., Marin M., Castagnaro M., Monge D., de Kinkelin P. - *Rapid lectin-based staining procedure for the detection of the myxosporean causing proliferative kidney disease in salmonid fish*. Dis. Aquat. Org., 13, 129-132, 1992.
- 7) Adams A., Marin de Mateo M. - *Immunohistochemical detection of fish pathogens*. In: Techniques in Fish Immunology. FITC-3. SOS Publications, 133-144, New Jersey, USA, 1994.
- 8) Marin de Mateo M., Adams A., Richards R.H., Castagnaro M., Hedrick R.P. - *Monoclonal antibody and lectin probes recognize developmental and sporogonic stages of PKX, the causative agent of proliferative kidney disease in European and North American salmonid fish*. Dis. Aquat. Org., 15, 23-29, 1993.
- 9) Lis H., Sharon N. - *Lectins: properties and applications to the study of complex carbohydrates in solution and on cell surfaces*. In: Ginsburg V., Robbins P.W., Biology of Carbohydrates, Vol. II, John & Wiley Sons, New York, 1-85, 1984.
- 10) Mahmoud A.A.F. - *Parasitic protozoa and helminths: biological and immunological challenges*. Science, 246, 1015-1022, 1989.
- 11) MacConell E., Smith C., Hedrick R.P., Speer C.A. - *Cellular inflammatory response of rainbow trout to the protozoan parasite that causes proliferative kidney disease*. J. Aquat. Anim. Hlth, 1, 108-118, 1988.

# CONTRIBUTO ALLO STUDIO DELLE NEOPLASIE EPATICHE NEI PESCI D'ALLEVAMENTO

CARAMELLI M., BOZZETTA E., PREARO M.,  
BISSO M.C., ROTILI F. (\*), GHITTINO C.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta (TO)*  
(\* - Medico Veterinario, S.M.A. Srl, Monticelli di Esperia (FR).

## RIASSUNTO

La patologia neoplastica più frequentemente descritta nei pesci è sicuramente quella relativa ai tumori epatici, la cui comparsa appare fondamentalmente legata a fattori ambientali e dietetici. A tal proposito, presso le più rappresentative piscicoltura italiane è stata condotta un'indagine sia sulle specie dulciacquicole che marine: reperti riferibili a neoplasie epatiche sono stati riscontrati esclusivamente in trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) e branzino (*Dicentrarchus labrax*).

L'epatoma della trota iridea, inteso come complesso di lesioni proliferative comprendenti quadri pre-neoplastici e neoplastici, è risultato essere un reperto a bassa prevalenza, a conferma di quanto riportato in bibliografia. Di un certo interesse è stato il riscontro di tale patologia, con elevata frequenza e presenza di quadri ad evoluzione maligna, in due popolazioni di un allevamento dell'Italia nord-occidentale.

Casi di colangioma e colangiocarcinoma sono invece stati osservati in riproduttori di branzino allevati presso una stazione di riproduzione artificiale della Costa Tirrenica.

## SUMMARY

The most frequently described neoplastic pathologies in fish are hepatic tumors, whose occurrence seem to be basically linked to environmental and dietetic factors. To confirm this, a survey in the most representative Italian fishfarms was carried out on both cultured freshwater and marine fish: hepatic neoplasia were recognized only in rainbow trout (*Oncorhynchus*

*mykiss*) and European seabass (*Dicentrarchus labrax*).

Rainbow trout hepatoma, considered as a complex of proliferative lesions, comprising preneoplastic and neoplastic features, was found to be a low prevalence finding, confirming what referred in bibliography. Of some interest is the report of this pathology, with a high occurrence and presence of lesions with malignant evolution, in two stocks from a troutfarm of North-Western Italy.

On the contrary, cases of cholangioma and cholangiocarcinoma were first observed in European seabass broodstock, reared by an artificial reproduction station on the Tyrrhenian Coast.

## INTRODUZIONE

Le neoplasie nei pesci rappresentano una patologia a carattere sporadico, la cui comparsa è generalmente correlata a fattori di tipo ambientale e nutrizionale. I tumori di origine epiteliale risultano essere i più frequenti, in relazione alla maggiore esposizione di questa componente tissutale all'insulto di tali fattori (Roberts, 1989).

Le neoplasie epatiche rappresentano le più importanti forme tumorali nei pesci allevati e sono state ampiamente descritte in diverse specie ittiche: *Parophrys vetulus* (Myers et al., 1987; Stehr e Myers, 1990), *Pseudopleuronectes americanus* (Murchelano e Wolke, 1991), *Oncorhynchus mykiss* (Hueper e Payne, 1961; Hendricks et al., 1984; Ghittino P., 1985; Prearo et al., 1994), *Salvelinus fontinalis* (Ghittino P., 1985), *Morone americanus* (May et al., 1987), *Cyprinodon variegatus* (Couch e Courtney, 1987). Sperimentalmente è stato possibile indurre tali neoplasie anche in *Oncorhynchus kisutch* ed *Ictalurus melas* (Ghittino P., 1970).

E' ormai accertato che i pesci prelevati da acque inquinate presentano una grande varietà di lesioni pre- e neoplastiche. Prima del 1965 risultavano estremamente rare le segnalazioni di neoplasie nei pesci delle acque libere (Masahito et al., 1988) ed attualmente vi sono ancora scarsissimi dati sul comportamento biologico e sul decorso clinico dei tumori nei pesci (Myers et al., 1990).

Con il termine di "epatoma" è consuetudine definire ogni stato patologico del parenchima epatico, a partire dalla degenerazione vacuolare, alla necrosi, fino ai veri e propri quadri tumorali (Ghittino P., 1985). In seguito al reperto di quadri di "epatoma" nell'ambito di una popolazione di trote iridea allevate presso un impianto dell'Italia settentrionale, aventi una prevalenza

assai più elevata rispetto alla norma (Prearo et al., 1994), si è ritenuto utile effettuare ricerche più approfondite sulle neoplasie epatiche delle specie ittiche allevate nel nostro Paese, correlandole, per quanto possibile, ad alcuni aspetti eziopatogenetici.

## MATERIALI E METODI

I campionamenti sono stati eseguiti nell'ambito di diverse specie ittiche, in soggetti di età e pezzatura diversa, in 32 allevamenti distribuiti sul territorio nazionale, durante il periodo autunno 1992 - autunno 1994.

La specie maggiormente studiata è stata la trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*), con monitoraggi presso 23 allevamenti variamente distribuiti sul territorio nazionale, includendo impianti di grandi e piccole dimensioni, aventi caratteristiche di conduzione diverse, ubicati su distinti bacini idrografici. Si è poi ritenuto opportuno effettuare prelievi in allevamenti dove si utilizzano tipi di alimentazione differenziale (mangimi commerciali, mangimi aziendali, diete miste con mangime commerciale integrato da scarti della lavorazione del pesce). In particolare sono state prese in considerazione 3 trotecolture in Piemonte, 5 in Lombardia, 2 in Trentino Alto Adige, 3 in Veneto, 3 in Friuli Venezia Giulia, 1 in Toscana, 2 in Umbria, 1 nelle Marche, 1 nel Lazio e 2 in Abruzzo.

Altro salmonide costantemente monitorato è stato la trota fario (*Salmo trutta*) con prelievi routinari presso un singolo allevamento del Piemonte; la maggiore selvaticità della specie ed il principale utilizzo per i ripopolamenti infatti, fanno sì che questa trota sia allevata in misura decisamente minore rispetto all'iridea.

Tra le specie dulciacquicole, è stata inoltre monitorata l'anguilla europea (*Anguilla anguilla*) in 3 allevamenti distribuiti in Piemonte, Lombardia e Veneto; per quest'ultima, come del resto per quasi tutte le specie studiate, si è proceduto a prelievi epatici ogni qual volta i campioni pervenivano al Centro per lo Studio delle Malattie dei Pesci dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta di Torino per le normali indagini di laboratorio.

Anche il branzino o spigola (*Dicentrarchus labrax*) e l'orata (*Sparus aurata*) sono stati oggetto di studio, con campioni provenienti essenzialmente dall'Italia centro-meridionale e più precisamente da 2 allevamenti in Toscana, 1 nel Lazio, 2 in Puglia ed 1 in Sicilia.

Prelievi epatici sono infine stati eseguiti in altri pesci, anche se non con la

necessaria regolarità: pescegatto (*Ictalurus melas*), carpa (*Cyprinus carpio*), salmerino (*Salvelinus fontinalis*), storione bianco (*Acipenser transmontanus*).

Dopo l'esame anatomopatologico, sezioni di tessuto epatico sono state fissate in formalina tamponata al 10%, incluse in paraffina e colorate con Ematossilina Fosina, PAS, Sudan III.

Sono state inoltre condotte analisi sulla composizione dei mangimi, per la determinazione di umidità, ceneri, protidi greggi, lipidi greggi, estrattivi inazotati. Sono stati valutati anche il grado di perossidazione e di acidità dei grassi della razione (tramite metodo NGD C35-1976 ed NGD C10-1976), la concentrazione di metionina (mediante idrolisi acida e valutazione del titolo con l'Aminoacid Analyzer), nonché la concentrazione di vitamina C (tramite analisi cromatografica liquida ad alta risoluzione con metodica di Felton). Inoltre si è proceduto a rilevare l'eventuale presenza di aflatossine, con metodica cromatografica tramite la tecnica ELISA (sensibilità di 5 ppb).

La presenza della vitamina C è stata ricercata anche a livello epatico, prelevando fegati da individui a digiuno e trattandoli con acido metafosforico al 2%, in rapporto di 1 gr/10 cc; il campione ha subito successivamente una omogeneizzazione per circa 30", in condizioni di oscurità ed a bassa temperatura ed una centrifugazione a 12.000 rpm a 4° C; il surnatante ottenuto è stato poi filtrato (filtri di 0,45 µ), valutando il titolo di ascorbato presente, mediante HPLC con metodica di Felton.

## **RISULTATI**

### **REPERTO ANATOMOISTOPATOLOGICO**

Tra tutte le specie esaminate, soltanto la trota iridea ed il branzino hanno presentato quadri istologici riferibili a lesioni pre-neoplastiche ed a neoplasie benigne e maligne.

#### **\* Trota iridea (*O. mykiss*)**

Nella trota iridea i casi hanno interessato due allevamenti dell'Italia Nord Occidentale. I reperti sono stati osservati soprattutto in trote di taglia superiore al chilo e sporadicamente in esemplari di taglia commerciale (400-550 gr.)

Macroscopicamente, all'apertura della cavità celomatica, si potevano apprezzare noduli protendenti sulla superficie epatica, di colorito bianco giallastro, di dimensioni comprese fra i 4-5 mm e fino a 3-4 cm, di consistenza soda. Al taglio i noduli si approfondivano nel parenchima sottostante, rimanendo tuttavia ben delimitati.

Su un totale di 474 fegati esaminati, 46 (9,7%), che macroscopicamente non mostravano lesioni, erano istologicamente caratterizzati da aree di alterata affinità tintoriale, con aspetti citologici appena lievemente alterati rispetto al normale epatocita. Questi quadri, definibili come foci basofili, eosinofili e del tipo "a cellule chiare", sono stati descritti da diversi Autori come "foci pre-neoplastici" (Hendricks et al., 1984; Myers et al., 1987).

In un soggetto (0,2%) è stato osservato un quadro di adenoma epatocellulare, caratterizzato da epatociti monomorfi, moderatamente ipertrofici, con citoplasma spiccatamente basofilo, disposti in struttura rosettoformi o cordoniformi.

In due esemplari (0,4%), il quadro istologico presentava aspetti decisamente più maligni: la normale citoarchitettura tubulo-sinusoidale appariva completamente sovvertita, con presenza di cellule neoplastiche fortemente basofile, irregolari per forma e dimensioni (alcune fusiformi), con diverse mitosi. In uno dei due casi, la forte predominanza della componente connettivale, che avvolgeva le strutture tubulari, ne configurava un aspetto francamente scirroso.

\* Branzino (*D. labrax*)

Nel branzino le lesioni neoplastiche sono state riscontrate soltanto in riproduttori di età compresa tra i 7 ed i 14 anni, allevati presso una stazione di riproduzione artificiale della Costa Tirrenica. Su un totale di 180 pesci presenti, tre esemplari venuti a morte presentavano fegati con evidenti alterazioni macroscopiche, caratterizzate da nodulini grigio-biancastri, di dimensioni variabili tra il grano di miglio ed il pisello, di aspetto compatto, disseminati sulla superficie epatica.

Il reperto istologico è risultato in un caso (0,55%) riferibile ad un colangioma, costituito interamente da elementi duttali biliari e stroma connettivale. Le cellule apparivano di forma colonnare con citoplasma debolmente eosinofilo e nuclei da rotondo ad ovale.

In due casi (1,1%) il quadro istopatologico si presentava con aspetti di maggiore malignità, contraddistinto da profili tubulari irregolari, con atteggiamento invasivo nei confronti del parenchima circostante. Si osservavano cellule neoplastiche di aspetto pleomorfo, con nucleoli evidenti; il tessuto fibroso, che avvolgeva i tubuli, si presentava talora in quantità minime, talora formava tralci abbondanti: in questi casi, è stata posta la diagnosi di colangiocarcinoma. Nel parenchima circostante si poteva apprezzare un numero cospicuo di centri melano-macrofagici, aumentati anche nel volume e spiccatamente positivi alla colorazione PAS e Sudan III.

## ANALISI CHIMICHE

Per quanto riguarda le analisi chimiche, eseguite sia sui mangimi commerciali che su quello aziendale, entrambi utilizzati per il razionamento delle trote al momento del riscontro della patologia, non è emerso nulla di significativo relativamente alla ricerca di aflatossine (assenti), al valore di acidità ed al numero di perossidi (nella norma); solo nei mangimi aziendali e a livello dei fegati di trota iridea con questi alimentate, la presenza di vitamina C è risultata incostante (valori da 20 a 60 ppm circa); metionina e colina erano inoltre presenti in concentrazioni non ottimali nella dieta (rispettivamente 1 mg/gr e 4 mg/gr di mangime) (Prearo et al., 1994).

## CONCLUSIONI

L'insieme delle lesioni pre-neoplastiche e neoplastiche epatiche rilevate nel nostro studio, rispecchia quanto descritto in bibliografia per i pesci delle acque libere (Hendricks et al., 1984; Myers et al., 1990). I quadri istopatologici hanno presentato aspetti del tutto sovrapponibili a quelli osservati in pesci e piccoli roditori da esperimento sottoposti ad epatocarcinogeni (Hendricks et al., 1984).

Dalle nostre osservazioni, la presenza nelle trote iridea di una vera e propria sequenza di eventi patologici, quali foci pre-neoplastici, quadri neoplastici benigni e maligni, suggerisce un'eziologia di natura tossica. Il danno iniziale è sicuramente di tipo degenerativo-necrotico, al quale seguirebbe una proliferazione compensatoria, di tipo rigenerativo; poi comparirebbero foci ad alterata affinità tintoriale, considerati come vere e proprie lesioni pre-neoplastiche (Hendricks, 1984).

Neoplasie epatiche sono state descritte non solo nella trota iridea (Wood e Larson, 1961; Ghittino P., 1970), ma anche in molte altre specie di pesci allevati e delle acque libere (Hendricks et al., 1984; Myers et al., 1987; May et al., 1987; Couch e Courtney, 1987; Stehr e Myers, 1990; Murchelano e Wolke, 1991). Nei pesci allevati, le aflatossine prodotte da *Aspergillus flavus* e contaminanti i mangimi, sono da ritenersi al primo posto tra i carcinogeni (Ghittino P., 1985). Nel nostro caso le analisi tossicologiche eseguite sul mangime al momento del riscontro della patologia, hanno escluso tale possibilità; va comunque tenuto conto che potrebbe essere stata sufficiente un'esposizione di breve durata nei primi stadi di allevamento (fase di accrescimento), per determinare lo sviluppo successivo dei tumori. Anche i traumi subiti durante la manipolazione, potrebbero aver giocato un ruolo fonda-

mentale nell'evoluzione a neoplasia di un tessuto già fortemente degenerato.

Per quanto riguarda i tumori epatici del branzino, non ci è stato possibile spingerci oltre la semplice segnalazione, anche se le ipotesi eziopatogenetiche parrebbero sovrapponibili a quelle prese in considerazione per la trota iridea.

E' noto che i pesci possono rappresentare un valido modello di carcinogenesi, in modo particolare in aree pesantemente contaminate da tossici ed inquinanti potenzialmente carcinogeni. La presenza di tumori nelle popolazioni di pesci destinate all'alimentazione umana deve destare allarme, non soltanto in quanto indicativa di un habitat acquatico fortemente compromesso dal punto di vista dell'inquinamento, ma anche per il rischio implicito per la salute umana (Ozonoff & Longnecker, 1991). A questo proposito va comunque ricordato che diverse sostanze responsabili di tumori nei pesci vengono completamente metabolizzate, come accade per esempio per gli idrocarburi poliaromatici, i quali non raggiungono i tessuti umani attraverso la catena alimentare, come dimostrato da Malins et al. (1985). D'altro canto, composti poco degradabili e metabolizzabili, come i PCB (policlorobifenili), il DDT od i metalli pesanti, rappresentano un reale pericolo in questo senso (Ozonoff & Longnecker, 1991). Sarebbe quindi auspicabile l'approfondimento dell'indagine sui potenziali cancerogeni presenti nelle parti edibili dei pesci con neoplasia, valutandone il rischio relativo.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Couch J.A., Courtney L.A. - (1987): *N-nitrosodiethylamine-induced hepatocarcinogenesis in estuarine sheepshead minnow (Cyprinodon variegatus): neoplasms and related lesions compared with mammalian lesions*. (J.N.C.I., 79, 2: 297-321).
- 2) Ghittino P. - (1970): *Piscicoltura ed ittiopatologia*. Vol. 2° *Ittiopatologia*. (Ed. Rivista di Zootecnia, Milano: 336-344).
- 3) Ghittino P. - (1985): *Tecnologia e patologia in acquacoltura*. Vol. II - *Patologia*. (Ed. Bono, Torino: 351-366).
- 4) Hendricks J.D., Meyers T.R., Shelton D.W. - (1984): *Histological progression of hepatic neoplasia in rainbow trout (Salmo gairdneri)*. (Natl. Cancer Inst. Monogr., 65: 321-334).
- 5) Hueper W.C., Payne W.W. - (1961): *Observations on the occurrence of hepatomas in rainbow trout*. (J. Nat. Cancer Inst., 27: 1123-1143).
- 6) Malins D.C., Krahn M.M., Myers M.S., Rhoders L.D., Brown D.V., Krone C.A., Mc Cain B.B., Chan S.L. - (1985): *Toxic chemicals in sediments and biota from a creosote-polluted harbor: relationship with hepatic neoplasms and other hepatic lesions in English Sole (Parophrys vetulus)*. (Carcinogenesis, 6: 1463-1469).
- 7) Masahito P., Takatoshi I., Sugano H. - (1988): *Fish tumors and their importance in cancer research*. (Jpn. J. Cancer Res., 79: 545-555).

- 8) May E.B., Lukacovic R., King H., Lipsky M.M. - (1987): *Hyperplastic and neoplastic alterations in the livers of White Perch (Morone americana) from the Chesapeake Bay.* (J.N.C.I., 79, 1: 137-143).
- 9) Murchelano R.A., Wolke R.E. - (1991) : *Neoplasms and non-neoplastic liver lesions in Winter Flounder, Pseudopleuronectes americanus, from Boston Harbor, Massachusetts.* (Envir. Health Perspcc., 90: 17-26).
- 10) Myers M.S., Landahl J.T., Krahn M.M., Johnson L.L., Mc Cain B.B. - (1990): *Overview of studies on liver carcinogenesis in English Sole from Puget Sound; evidence for a xenobiotic chemical etiology, I: pathology and epizootology.* (The Science of the Total Environment, 94: 33-50).
- 11) Myers M.S., Rhodes L.D., Mc Cain B.B. - (1987): *Pathologic anatomy and patterns of occurrence of hepatic neoplasms, putative preneoplastic lesions, and other idiopathic hepatic conditions in English Sole (Parophrys vetulus) from Puget Sound, Washington.* (J. Natl. Cancer Inst., 78, 2: 333-351).
- 12) Ozonoff D., Longnecker M.P. - (1991): *Epidemiologic approaches to assessing human cancer risk from consuming aquatic food resources from chemically contaminated water.* (Envir. Health Persp., 90: 141-146).
- 13) Prearo M., Bozzetta E., Bisso M.C., Ghittino C. - (1995): *Indagine istologica su una popolazione di trote iridea d'allevamento affetta da patologie epatiche.* (Boll. S.I.P.I., 16: 34-39).
- 14) Roberts R.J. - (1989): *Fish pathology. Second edition.* (Baillière Tindall, London: 153-172).
- 15) Stehr C.M., Myers M.S. - (1990): *The ultrastructure and histology of cholangiocellular carcinomas in English Sole (Parophrys vetulus) from Puget Sound, Washington.* (Toxicol. Path., 18, 3: 362-372).
- 16) Wood E.M., Larson C.P. - (1961): *Hepatic carcinoma in rainbow trout.* (Arch. Path., 71: 471-479).

**INDAGINE ISTOLOGICA E  
IMMUNOISTOCHEMICA IN BRANZINI  
(*Dicentrarchus labrax*) INFETTATI  
SPERIMENTALMENTE CON  
*Pasteurella piscicida***

GALEOTTI M., VOLPATTI D., DEL GRANO N., VOLPELLI L.A.  
*Dipartimento di Scienze della Produzione Animale, Università di Udine*

CESCHIA G., GIORGETTI G.  
*Dipartimento di Ittiopatologia, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle tre Venezie*

ADAMS S., RICHARDS R.  
*Institute of Aquaculture, University of Stirling, Scotland*

## **INTRODUZIONE**

La Pasteurellosi ittica, conosciuta anche con il nome di "Pseudotubercolosi", è una malattia provocata da *Pasteurella piscicida*, batterio Gram negativo appartenente alla famiglia delle Pasteurellaceae, che colpisce specie ittiche marine sia selvatiche che allevate. La malattia è stata segnalata per la prima volta in Italia nel 1990, con numerosi episodi in allevamenti e valli da pesca del Nord Adriatico (Ceschia et al., 1990, 1991; Doimi et al., 1991). Essa ha provocato ingenti perdite economiche nell'allevamento intensivo del branzino (*Dicentrarchus labrax*). La presente ricerca, al fine di approfondire le conoscenze sulla patogenesi e sul quadro istopatologico indotto dalla Pasteurellosi nel branzino, si propone di provocare sperimentalmente le forme acuta e cronica della malattia, monitorandole nella loro evoluzione con l'ausilio di tecniche istologiche e immunoistochimiche.

## **MATERIALE E METODI**

### **Vasche, condizioni ambientali, pesci.**

Le prove di infezione sono state condotte in vasche di 140 l nelle quali venivano mantenute le seguenti condizioni ambientali: ricambio d'acqua 1,5-

2 l/min.; ossigenazione; condizionamento termico dell'acqua in entrata (24-28° C); pH tra 8,0 e 8,4; salinità tra 33 e 38 ‰. I pesci provenivano da un allevamento intensivo presente in regione.

### **Batteri utilizzati per l'infezione.**

Ceppi di *Pasteurella piscicida* isolati da recenti episodi di malattia ed identificati mediante Galleria API come 20E200 5004, a 20-25°C.

### **Modalità di infezione.**

a) **Prima prova di immersione** (1-IM). 111 branzini di 50 g immersi in vasche contenenti sospensione batterica con titolo  $3 \times 10^5$  ufc/ml per tempi diversi: 15' (36 soggetti), 30' (38 soggetti) e 60' (37 soggetti).

b) **Seconda prova di immersione** (2-IM). 60 branzini di 70 g immersi per 30' in vasche contenenti sospensione batterica a diverso titolo:  $2.5 \times 10^3$ ,  $2.5 \times 10^2$  e  $2.5 \times 10$  ufc/ml (20 soggetti cd).

### **Reisolamento batterico.**

Da fegato, milza e rene di pesci morti spontaneamente e/o campionati durante le prove 1-IM e 2-IM sono state effettuate colture su BHA+NaCl 2% per il reisolamento di *P. piscicida*.

### **Istologia.**

Gli esami istologici sono stati effettuati su pesci morti spontaneamente e/o prelevati, secondo schemi diversificati per le 2 prove (viene considerato giorno 0 quello in cui è stata effettuata l'infezione).

**1-IM**: campionamenti a 30', 60', 6h, 10h, 23h, 34h, 4° e 5° giorno dall'infezione (2 soggetti cd.).

**2-IM**: campionamenti periodici al 19°, 69° e 84° giorno dall'infezione.

Dai pesci sono stati prelevati i seguenti organi: fegato, milza, rene anteriore, cuore, stomaco, intestino, branchie, muscolo, talora cute, cervello, gonadi e occhio. I campioni sono stati fissati in formalina tamponata al 10%, inclusi in paraffina e processati con le comuni tecniche istologiche. Sezioni di 5  $\mu$  ottenute al microtomo, sono state colorate con Ematossilina Eosina per l'osservazione al microscopio.

### **Immunoistochimica.**

Su parte delle sezioni istologiche è stata applicata una tecnica immunoistochimica per evidenziare la presenza di *P. piscicida*. La metodica in breve è la seguente: 1) incubazione con antisiero primario anti *P. piscicida*

ottenuto da coniglio (dil. 1:1000/1:3000); 2) incubazione con anticorpo biotinilato di capra anti-coniglio (DAKO, Milano) (dil.1:100); 3) trattamento con complesso avidina-biotina perossidasi (DAKO, Milano); 4) sviluppo della reazione in 3,3'- diaminobenzidina (0,04%) (Sigma, Milano).

## **RISULTATI**

### **Mortalità**

Per quanto riguarda la 1-IM tutti i pesci sono deceduti entro il 6° giorno dall'infezione. All'aumentare dei tempi di esposizione, il picco di mortalità è risultato più precoce, rilevandosi al 3°giorno per esposizione (E) = 60 min, al 4°giorno per E = 30 min, al 5°giorno per E = 15 min. Nel caso della 2-IM non è stato rilevato alcun decesso in seguito al trattamento.

### **Lesioni macroscopiche**

Nella 1-IM i branzini mostravano evidenti alterazioni macroscopiche: lamelle branchiali conglomerate e di colore chiaro, fegato con punteggiature emorragiche, splenomegalia, emorragie diffuse agli organi interni e alla cute, piccole lesioni cutanee circolari di tipo erosivo. Nel caso della 2-IM i campionamenti non hanno evidenziato alcuna lesione anatomopatologica.

### **Esame batteriologico**

Nel caso della prova 1-IM, l'esame colturale effettuato da milza, fegato e rene ha permesso di reisolare *P. piscicida*.

### **Lesioni istologiche**

Istologicamente, nel caso della prova 1-IM, 30' e 60' dopo l'esposizione i soggetti prelevati presentavano unicamente una modesta congestione splenica, cui si aggiungeva, 6 h e 10 h dopo l'infezione, un infiltrato flogistico in corrispondenza del bulbo arterioso cardiaco. 34 h dopo l'esposizione iniziava il coinvolgimento delle branchie, con iperplasia e fusione delle lamelle secondarie, e della milza, con comparsa di piccole aree necrotiche e focolai batterici al centro delle stesse. A partire dal 2° e 3° giorno fegato, rene e milza evidenziavano alcune colonie batteriche ed aree di parenchima necrotico; le lamelle branchiali presentavano modesta fusione e necrosi; inoltre si osservava sfaldamento della mucosa gastrica ed intestinale con evidenti colonie batteriche presenti anche nella sottomucosa e sierosa. Il cuore evidenziava aree necrotiche con batteri. Il cervello, fortemente

congesto, presentava focolai batterici internamente ai vasi. In concomitanza venivano rilevati piccoli focolai batterici nei muscoli scheletrici. Al 4° giorno dopo l'esposizione nella milza, nel rene e nel fegato le aree necrotiche apparivano numerose e invase da colonie batteriche; la necrosi e lo sfaldamento dell'epitelio gastrico ed intestinale risultavano imponenti. Per quanto concerne la 2-IM, dall'esame istologico condotto sugli organi di alcuni soggetti campionati 69 e 84 giorni dopo l'infezione si rilevavano alterazioni trascurabili.

### Immunoistochimica

I risultati relativi alla localizzazione immunoistochimica dei batteri vengono descritti in Tabella 1.

Tab. 1- Localizzazione immunoistochimica di *P. piscicida* negli organi dei branzini infettati.

tempo intercorso dall'esposizione	1-IM 10 h	1-IM 34 h	1-IM 2 giorni	1-IM 3 giorni	1-IM 4 giorni	2-IM 69 e 84 giorni
milza	+	-	(*)	+	+	+
cuore	+	-	(*)	+	+	-
stomaco/intestino	++	++	+	+	+	-
fegato	-	-	+	+	+	-
rene	-	-	+	+	+	-
branchie	+	+	(*)	+	+	-
muscolo/cute	-	(*)	+	(*)	+	(*)
cervello	(*)	-	(*)	+	(*)	(*)

+ = presenza di batteri;

- = assenza di batteri;

(\*) = non testato.

### DISCUSSIONE

Nella presente indagine la mortalità riscontrata durante la prova 1-IM raggiunge i massimi livelli verso il 4° giorno; entro il 6° giorno tutti i pesci sono venuti a morte. In tempi desunti dalla letteratura, la mortalità appare dopo 3-7 giorni come nella ricciola (Wakabayashi et al., 1977) e dopo 70 h in spigole americane infettate per via intraperitoneale con  $1 \times 10^7$  cellule batteriche (Allen e Pelczar, 1967). Il quadro anatomopatologico qui riportato è assimilabile a quello desunto in letteratura in caso di Pasteurellosi acuta

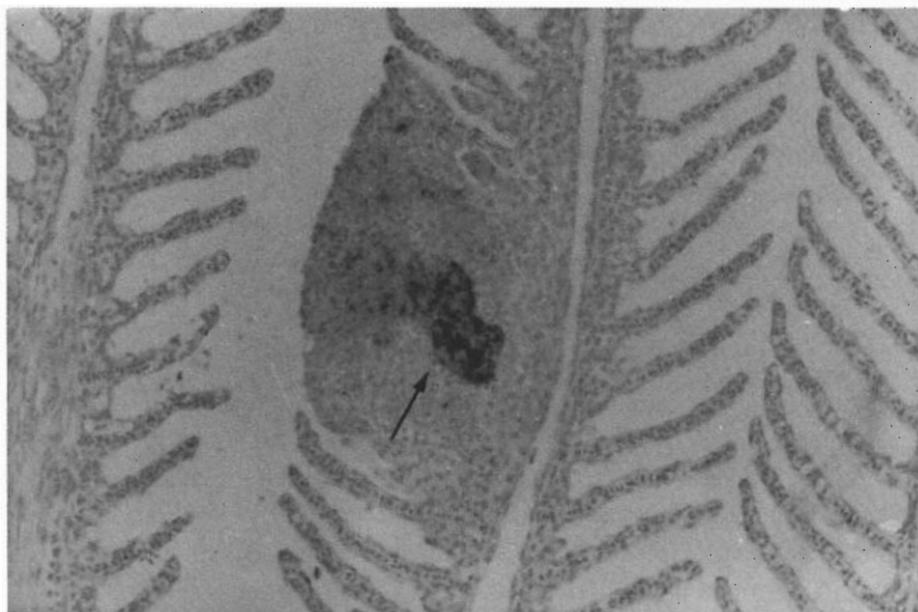


Fig. 1 - Branzino. I-IM. Branchie. Evidenziazione immunoistochimica di un aggregato batterico fortemente positivo (freccia). Immunoperossidasi. 20x.

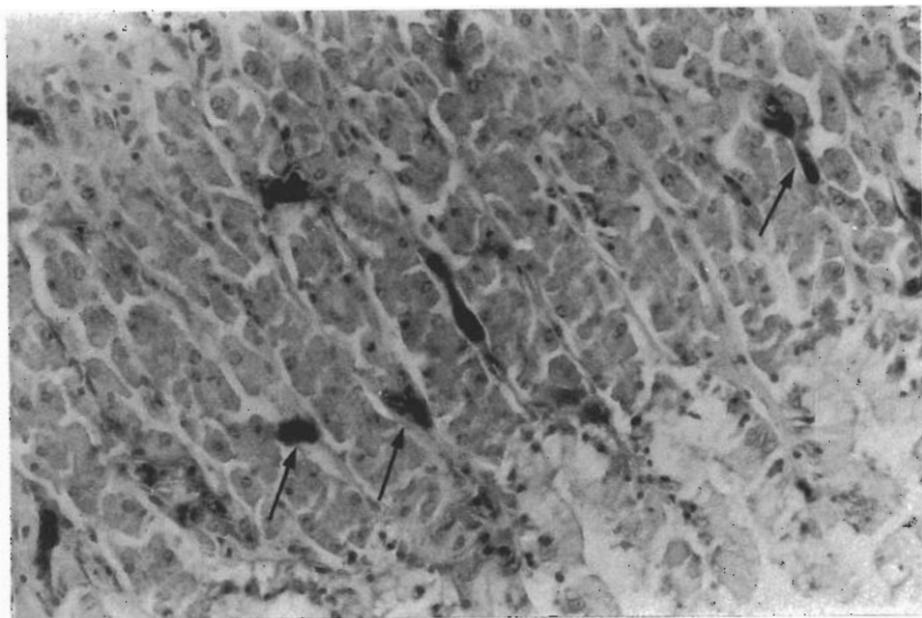


Fig. 2 - Branzino. I-IM. Stomaco. Numerosi aggregati di batteri positivi (freccie) in corrispondenza della mucosa gastrica. Immunoperossidasi. 40X.

del branzino (Ceschia et al., 1990; Quaglio et al., 1991; Santagada et al., 1991). Le lesioni cutanee di tipo erosivo, da noi descritte, sono state osservate soltanto nella ricciola giapponese da Egusa (1993), mentre nei branzini sono state evidenziate solo aree discromiche più chiare (Quaglio et al., 1991). Per quanto concerne l'evoluzione delle lesioni e la localizzazione del batterio, entro le prime 10 h dall'infezione lo stomaco, l'intestino, il cuore, la milza e le branchie sono gli organi più precocemente coinvolti. A 34 h nella milza compaiono le prime lesioni necrotiche, nelle quali però non si rinven-gono batteri. Al 2° e 3° giorno si osserva la vera e propria diffusione setticemica dei batteri che vengono rinvenuti in numerosi organi, fra i quali: branchie, fegato, rene, cuore, milza, intestino, stomaco, muscolo e cervello. I fenomeni necrotici sono molto estesi. Al 4° giorno sono ancora evidenti le alterazioni branchiali, dove si osservano batteri immunopositivi, mentre nella milza si fanno più gravi le lesioni necrotiche. Questi risultati sembrano indicare nello stomaco e intestino gli organi più precocemente coinvolti dai batteri. Tali organi potrebbero costituire una importante via di entrata dell'infezione nel branzino, contraddicendo quanto precedentemente riportato da Kawahara e Kusuda (1989) nel caso della ricciola, ovvero che durante l'esposizione per immersione in sospensione batterica le branchie costituiscono la più probabile via di penetrazione dell'infezione. Nella 2-IM la situazione è stata molto diversa, infatti le basse concentrazioni batteriche utilizzate sono state incapaci di scatenare una forma acuta di malattia e non hanno determinato l'insorgenza di lesioni tipiche della forma cronica di Pasteurellosi. Appare comunque interessante il rinvenimento, 84 giorni dopo l'esposizione (Tab.1), di batteri immunopositivi all'interno di alcune cellule di tipo macrofagico nella milza. Verrebbe in tal modo dimostrata con una tecnica immunoistochimica la permanenza di *P.piscicida* in organi di pesci venuti a contatto con la malattia ed apparentemente sani. Situazione, questa, già prospettata in passato da Egusa (1993) e Nelson et al. (1989), che potrebbe confermare l'esistenza di pesci "carrier", potenzialmente molto pericolosi per la permanenza e la diffusione della malattia negli allevamenti.

### RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia il Laboratorio di Biologia Marina di Aurisina (Trieste) per aver gentilmente fornito i locali dove è stata attuata la sperimentazione.

Si ringrazia il Sig. Pierluigi Bagatella per l'allestimento dei preparati istologici. Ricerca effettuata con fondi PIM 2ª fase - 1993 Regione Autonoma Friuli Venezia Giulia LR 27.12.89 n. 40.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Allen N. e Polczar M. (1967). Bacteriological studies on the white perch (*Roccus americanus*). Chesapeake Sci. 8, 135-154.
- 2) Ceschia G., Giorgetti G. e Bovo G. (1990). Grave epizootia da *Pasteurella piscicida* in specie eurialine del Nord Adriatico. Boll. Soc. It. Patol. Ittica; 4, 11-17.
- 3) Ceschia G., Quaglio F., Giorgetti G., Bertola G., Bovo G. (1991). Serious outbreak of pasteurellosis (*Pasteurella piscicida*) in euryhaline species along the Italian coasts. Fifth Int. Conf. "Diseases of fish and shellfish", Budapest, 26 (abstr.).
- 4) Doimi M., Quaglio F., Manfreda G. e Giorgetti G. (1991). Studies on fish pasteurellosis: an epizootic disease in venetian lagoon. E.A.F.P. Fifth Int. Conf. "Diseases of fish and shellfish", Budapest, 139 (abstr.).
- 5) Egusa S. (1983). Disease problems in Japanese yellowtail *Seriola quinqueradiata*, culture: a review. Rapp. P-V Reun. Cons. Int. Explor. Mer., 182, 10-18.
- 6) Kawahara E., Kawai K., Kusuda R. (1989). Invasion of *Pasteurella piscicida* in Tissues of Experimentally Infected Yellowtail *Seriola quinqueradiata*. Nippon Suisan Gakkaishi 55(3), 499-501.
- 7) Nelson J.S., Kawahara E., Kawai K. e Kusuda R. (1989). Macrophage infiltration in pseudotuberculosis of yellowtail. Bull. Mar. Sci. Fish. Kochi Univ.; 11, 17-22.
- 8) Quaglio F., Fucilli F., Bertola G.L. e Giorgetti G. (1991). Rassegna sulla pasteurellosi ittica. Riv. It. Acquac.; 26, 179-187.
- 9) Santagada G., Marinelli M., Latorre L., Cozzolino P. e Ceschia G. (1991). *Pasteurella piscicida*: grave episodio in un allevamento ittico della provincia di Matera. Boll. Soc. It. Patol. Ittica; 7, 32-37.
- 10) Wakabayashi H., Toyota H. e Egusa S. (1977). Artificial infection of yellowtail with a gastral administration of cultured *Pasteurella piscicida* cells. Fish Pathol.; 11, 207-211.

# NOTE A MARGINE DI ALCUNE LESIONI PARASSITARIE DELLA MUSCOLATURA DEL PESCE SPADA (XIPHIAS GLADIUS)

GELMETTI D.\*, MANFREDI M.T.\*\* , CAMMARATA G.\*\*\*

\* *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia "B. Ubertini", Brescia*

\*\* *Istituto di Patologia Generale Veterinaria, Milano*

\*\*\* *Istituto Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviaria, Milano*

Il pesce spada (*Xiphias Gladius*) è notoriamente soggetto a diverse infestazioni parassitarie correlate all' ambiente marino in cui vive (Grabda,1991).

Le lesioni parassitarie del muscolo, nella maggior parte dei casi, sono repertate in modo occasionale soprattutto dal venditore dettagliante in quanto questo pesce, nel circuito commerciale all'ingrosso, viene venduto intero e molte delle lesioni suddette non sono immediatamente riconoscibili all'esame della superficie corporea. (Pellegrino et al.,1987).

In questa nota sono ricordate tre delle più comuni parassitosi profonde della muscolatura del pesce spada, così come si presentano all' osservazione nel momento in cui esso viene tranciato a fette. La descrizione di tali reperti ci è parsa utile in quanto contribuisce a spiegare l'aspetto delle lesioni come fenomeno interattivo tra reazione ospitale e ciclo vitale del parassita. Coloro che non abbiano acquisito una diretta esperienza possono infatti trovare difficoltà a reperire adeguate fonti d'informazione e documentazione in proposito.

I reperti qui descritti riguardano casi di parassitosi muscolari del pesce spada sostenuti da: Pennella instructa Wilson 1917 (copepode), Molicola horridus (larva plerocerca di Cestode Trypanorhynca), Maccalumtrema xiphiados (sin. Didymocystis xiphiados) (trematode).

Le lesioni muscolari da

\*\* PENNELLA INSTRUCTA sono state da noi osservate in esemplari di *Xiphias Gladius* pescati nel mar Mediterraneo . Il reperto più comune era rappresentato da formazioni nodose molto consistenti, biancastre, elissoidali o cordoniformi, con diametro massimo di circa 4-5 cm incluse nella profon-

dità delle masse muscolari, ben delimitate e facilmente asportabili . Alla sezione presentavano struttura cava a parete rigida (di spessore fino ad 1 cm), di aspetto lardaceo (Fig. 1 A). La cavità interna era occupata da una porzione di corpo parassitario di cui era riconoscibile l'involucro chitinoso a sezione tubulare. L'esame di numerosi campioni di muscolo permetteva di rinvenire corpi parassitari più o meno incompleti e di ricostruire in base a questi la morfologia del parassita intero. In questo ultimo si distingueva una porzione cefalo-toracica in forma di tozzo cilindro con disco anteriore ricoperto di sporgenze verrucose, disposte in archi concentrici. Sulla superficie ventrale di questo tratto si riconoscevano, meglio se con l'aiuto di un microscopio stereoscopico, 4 paia di arti pigmentati, regrediti a piccolissime dimensioni. Dalla porzione cefalo toracica si dipartivano due lunghe appendici corniformi, leggermente arcuate e divergenti con apice a volte pigmentato, rosso-bruno. Il tronco del parassita, anch'esso di forma tubulare e di diametro molto simile a quello delle appendici corniformi descritte, appariva spesso interrotto e solo in rari casi affiorava alla superficie cutanea . La parte sporgente all'esterno (Fig. 1B), quando presente, aveva diametro maggiore ed assumeva un aspetto segmentato, pseudometamerico. Il tratto terminale, di colore nero, era fornito di filamenti laterali ramificati a guisa di penna e dalla sua estremità più caudale si dipartivano due sottili e lunghe sacche ovigere filamentose. Le dimensioni dei parassiti rinvenuti (circa 20 esemplari) variavano considerevolmente, facendo registrare lunghezze comprese tra 2 e 8 cm, esclusa la porzione sporgente esternamente, di solito mancante. La reale lunghezza del parassita intero poteva essere conseguentemente stimata tra i 6 i 24 cm. I pennellidi, come altri copepodi, sono a sessi separati, ma solo la femmina si comporta come parassita . Non è ben noto quali siano le sue dimensioni nel momento in cui penetra nell'ospite definitivo, tuttavia la diversa dimensione degli esemplari rinvenuti (Fig. 2) sembra dimostrare che essa si accresce per un certo tempo all'interno delle masse muscolari del pesce. Appare anche evidente che il parassita conclude in questa sede il suo ciclo vitale. Infatti, pressochè nella totalità dei casi osservati esso era completamente circondato da una spessa capsula connettivale quale espressione di una reazione infiammatoria di vecchia data mentre, come dimostrato anche all'esame istologico, le uniche parti del parassita conservate erano costituite dall'esoscheletro, essendo pressochè completamente autolisato ogni suo altro tessuto organico.

Va dunque sottolineato che il veterinario ispettore, nella maggioranza dei casi, può osservare esternamente soltanto una lesione cutanea di modeste

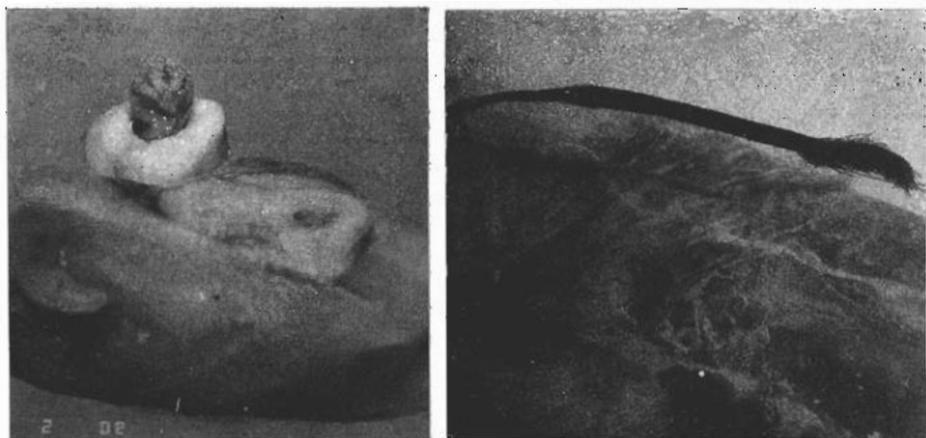


Fig. 1 - *Xiphias gladius* infestazione muscolare da *Pennella instructa*.  
 A: Porzione cefalica del parassita racchiuso in una spessa capsula connettivale;  
 B: Porzione caudale libera del parassita infisso nella cute.



Fig. 2 - Esemplari femminili incompleti di *Pennella instructa* estratti da muscolatura di *Xiphias gladius*. Si noti la diversità di dimensioni.

dimensioni sotto forma di un forellino di 2-3 mm di diametro, con margine interno rivestito da una sottile pellicola chitinosa. Profondamente, nelle masse muscolari, si trova invece, di solito, una spessa capsula connettivale del diametro fino a 3 o 4 cm, contenente l'esoscheletro del parassita morto, circondato da materiale necrotico, in parte calcificato.

In base alla nostra esperienza, sembra che attualmente, le infestazioni del pesce spada da parte di *Pennella instructa*, ancorchè poco segnalate, non siano rare nel mar Mediterraneo (Brian, 1906, Penso, 1950).

**\*\* MOLICOLA HORRIDUS:** anche i reperti riferibili a questa parassitosi del pesce spada sono considerati piuttosto comuni (Pellegrini, 1984; Grabda, 1991; Manfredi 1993). Nella pratica, il parassita è visibile, all'esame della superficie di sezioni trasversali della muscolatura, sotto forma di striature biancastre confondibili con venature di grasso o con tratti di vasi di piccolo calibro. Solo con notevole difficoltà è possibile separare il parassita dalla circostante muscolatura, che presenta aspetto normale e colore rosco, attenuato (Fig. 3). Nel muscolo il parassita si trova in posizione incurvata ad U o un pò spiralizzata. Il corpo del parassita isolato si presenta di colore bianco perlaceo, lungo da 2,5 a 3,5 cm., a sezione rotondeggiante, del diametro di 2-3 mm, più sottile anteriormente. Lo scolice è munito di 4 proboscidi o trombe ciascuna armata da una serie di uncini, che vanno riducendosi verso la sommità. I caratteri generali del parassita e quelli particolari, come la disposizione degli uncini, utili alla sua corretta identificazione sono rilevabili all'esame microscopico. All'esame istologico sezioni del parassita sono state evidenziate tra fasci di fibre muscolari prive di alterazioni significative, ma talvolta è stato possibile riscontrare anche gli equivalenti di una flogosi interstiziale diffusa, accompagnata da alterazioni delle miofibre, di estensione e gravità ben più notevoli di quanto sospettabile all'esame macroscopico. In questi casi la reazione cellulare infiammatoria era maggiormente addensata attorno al corpo del parassita e lungo il tragitto migratorio dello stesso (Fig. 4).

A commento di questo reperto va rilevato che la lesione passa il più delle volte inosservata o, addirittura, il pallore delle masse muscolari che ad essa si accompagna, viene considerato, nella credenza popolare, un indice di miglior qualità. Che *Molicola horridus* sia capace di provocare gravi lesioni muscolari a carattere infiammatorio e regressivo è stato del resto dimostrato anche in altre specie ittiche (*Mola mola*) da Pellegrini et al., 1984. E' dunque una fortuna che questo parassita non sia patogeno per l'uomo perchè, non solo la sua presenza e quella della miosite da esso indotta non sembra deter-

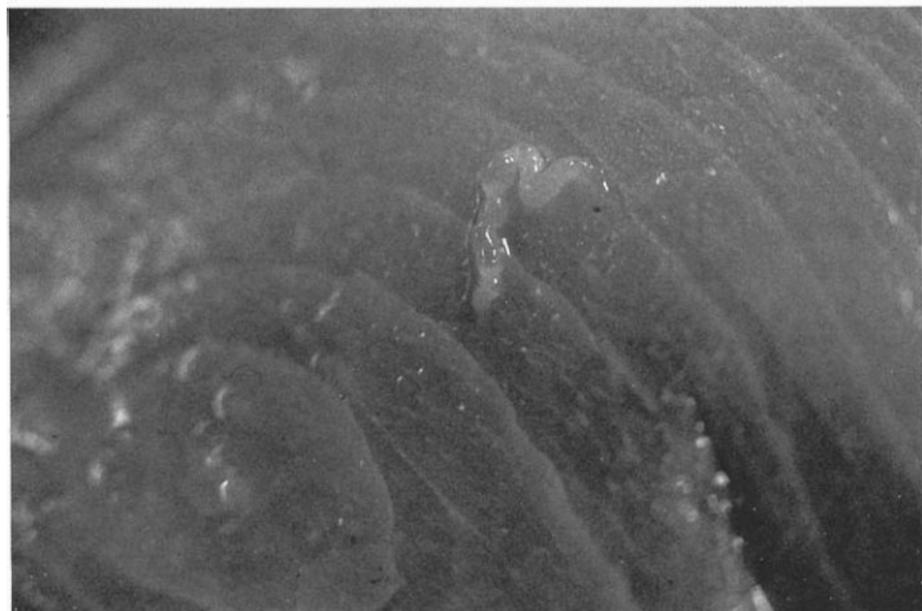


Fig. 3 - *Xiphias gladius*, sezione trasversale di muscolo con infestazione da *Molicola horridus*. Si noti il pallore della carne. Il parassita è al centro.

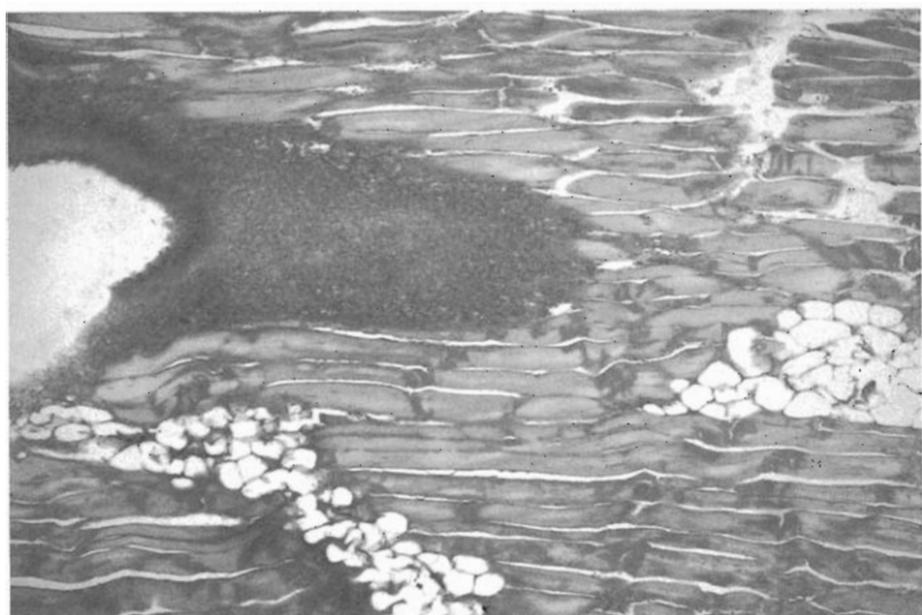


Fig. 4 - Muscolo di *Xiphias gladius* infestato da *Molicola horridus*: Infiltrato di cellule infiammatorie mononucleate in corrispondenza di un tragitto parassitario. Le fibre muscolari sono diffusamente colpite da alterazioni regressive spinte fino alla necrosi (E.E. 100x)

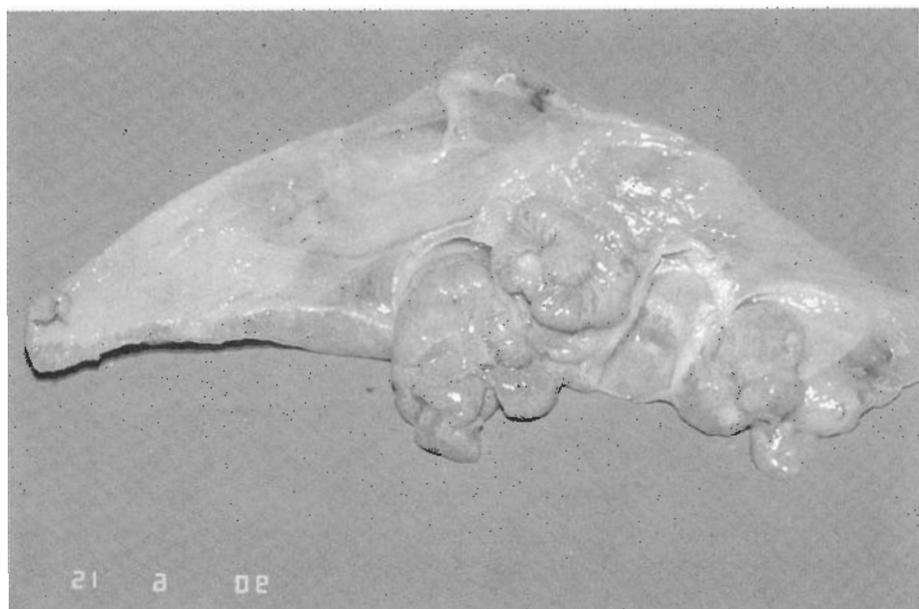


Fig. 5 - *Xiphias gladius*, infestazione muscolare da *Maccalumtrema xiphiados*. Benchè adiacenti, le cisti parassitarie sono separate e contengono ciascuna un solo parassita.

minare lo scadimento delle qualità organolettiche delle carni, ma paradossalmente, secondo il gusto di taluni, le migliorerebbe.

\*\* **MACCALUMTREMA XIPHIADOS** (sinonimo **DIDYMOCYSTIS XIPHIADOS**): conformemente a quanto risulta dalla letteratura (Panebianco et al, 1994), anche nel nostro materiale questa parassitosi è risultata più rara delle precedenti. Le nostre osservazioni si riferiscono pertanto a due soli esemplari di pesce spada pescato nel Mediterraneo.

All'esame esterno, l'unico reperto apprezzabile era quello di una o più protrusioni a calotta sferica, poco rilevate sulla superficie cutanea integra, con base di diametro di circa 2-3 cm, situate posteriormente agli opercoli in posizione toracica. Incidendo la cute si evidenziavano cisti di diametro fino a 4-6 cm a parete sottile, ma non trasparente, completamente chiuse, con qualche piccolissima sporgenza superficiale. Le formazioni cistiche si ricavano uno spazio nella muscolatura sottostante restando comprese tra questa ed il sottocute (Fig. 5). Il muscolo, localmente compresso, era in parte atrofizzato. All'interno della capsula di contenimento si osservava un corpo parassitario, complessivamente globoso, molle, di colore giallo-arancio, più grigiastro in superficie, formato da una struttura complessa a lobi

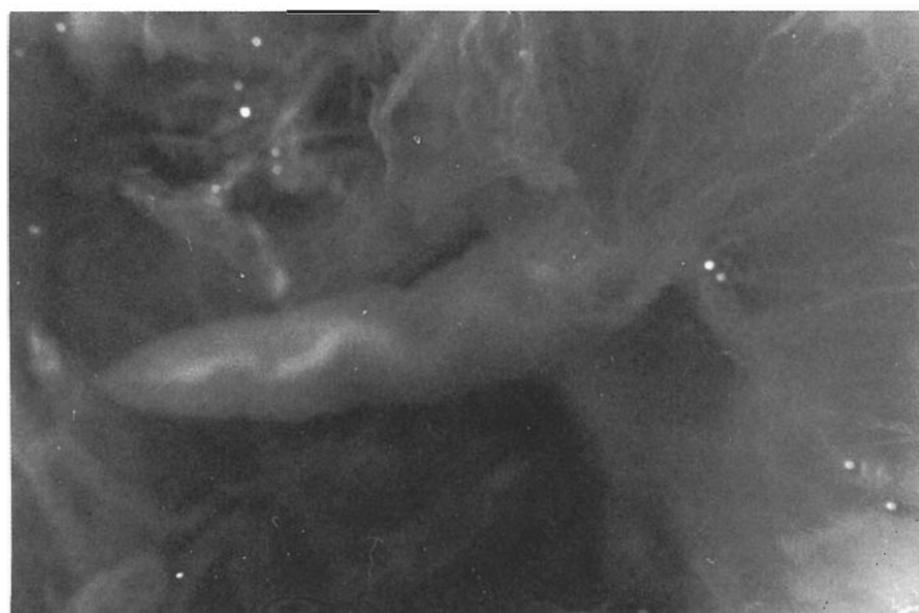
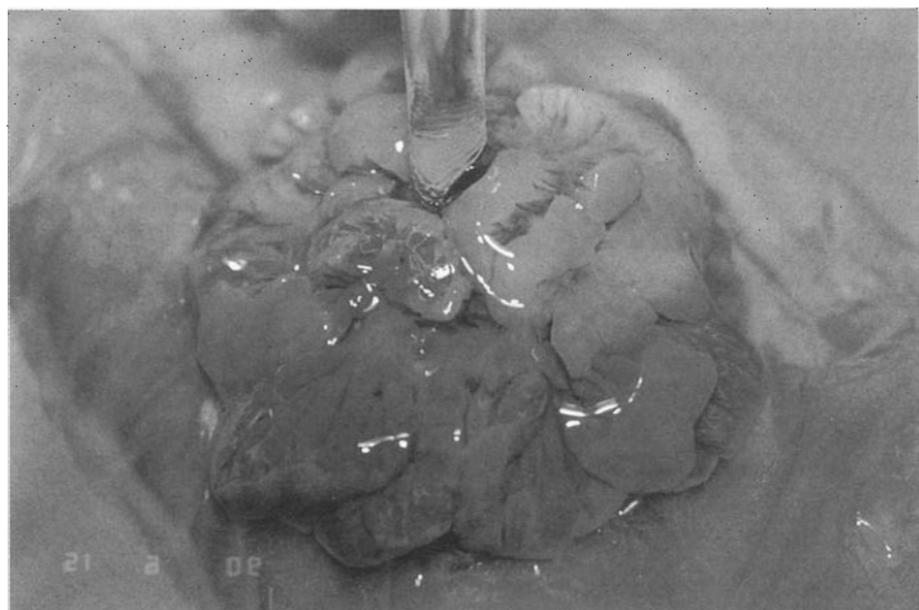


Fig. 6 - *Maccalumtrema xiphiados*,  
A: parassita isolato: è visibile la massa corporea costituita prevalentemente dall'utero pieno di uova;  
B: tratto cefalico rinvenibile al centro del parassita (40x).

multilamellati, connessa ad una sottile membrana semitrasparente, convergente al centro della massa corporea del parassita, dove era rinvenibile un tratto cefalico, lungo 2-3 mm, affusolato, percorso da un canale spiraliforme visibile per il contenuto giallastro (Fig. 6). Tra le strutture lamellari erano comprese, e localmente concentrate, strutture tubulari ramificate di colore bianco. In alcuni casi le formazioni cistiche descritte contenevano il parassita morto e degenerato, ridotto ad un ammasso amorfo di materiale giallastro, poltaceo mentre poteva apparire più consistente la reazione ospitale demarcante.

Il *Maccalumtrema Xiphiados* è come noto un trematode e, come tale, un ermafrodita completo. La morfologia del parassita è stata dettagliatamente descritta da Leoni et al. 1988. La parte posteriore, più voluminosa del suo corpo è costituita dall'apparato genitale comprendente testicoli doppi, tubulari e, principalmente, un grosso utero rigonfio, molto lungo, circonvoluto e pieno di uova. La parte anteriore del corpo, molto breve, visibile solo con qualche difficoltà, meglio se con l'aiuto del microscopio stereoscopico, è percorsa da esofago, intestino e dal tratto terminale dell'utero e porta alla sommità il poro genitale ed una piccola ventosa orale.

Le uova, abbondantissime, all'esame microscopico a fresco appaiono ovali, opercolate, con asse maggiore di circa 20 micron, e sono per lo più embrionate. Se tra le uova ve ne sono di aperte, si osservano anche miracidii liberi ovoidali, in cui si distingue una parte cefalica, separata dal resto del corpo, due volte più lungo, da una strozzatura anulare. Il miracidio è munito di appendici craniali e caudali.

La lesione impone una toelettatura delle parti colpite, che viene anche in questo caso eseguita dal venditore dettagliante per motivi più estetici che igienici, trattandosi di un parassita non patogeno per l'uomo e in tal modo molti reperti sfuggono completamente all'osservazione del veterinario. Forse anche per questa ragione, il ciclo biologico del *Maccalumtrema xiphiados* non è ancora ben conosciuto e mancano notizie circa le lesioni iniziali rilevabili al momento dell'infestazione (Panebianco et al. 1994). E' pure oggetto di discussione come il parassita, alloggiato in una nicchia tessutale completamente chiusa, possa eliminare all'esterno le sue uova per il proseguimento del ciclo vitale della specie. Si ritiene che il pesce, perchè si liberino le uova, debba necessariamente morire ed andare incontro a disfacimento od essere predato. Le attuali conoscenze potranno forse essere migliorate attraverso uno studio più sistematico ed approfondito del parassita e della sua capsula, nonchè delle circostanze che, a volte, ne determinano la morte nei tessuti dell'ospite.

A commento generale sulle osservazioni e considerazioni esposte vogliamo per ora soltanto ribadire che, così come per molti altri reperti, anche per le più note parassitosi muscolari del pesce spada, la collaborazione tra ispettori, parassitologi ed anatomo-patologi veterinari può portare ad una valutazione più completa del problema in virtù di un approccio multidisciplinare.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Kabata Z.(1981): *Advances in parasitology*. Ed. Academic Press 2-71.
- 2) Yamaguti S. (1963): *Parassitic Copepoda and Bruchiura of Fisheses*. Ed. Interscience N.Y.
- 3) Grabda J. (1991): *Marine Fish Pathology*. Polish Scientific Publishers, Warsawa.
- 4) Leoni A., Piras P.L., Siddi M.R. (1988): *Didymocystis xyphiados in Xiphias gladius del Mediterraneo*. *Parassitologia*, 30 :107-108
- 5) Manfredi M.T., Gandini G., Traldi G. (1993): *Infestazione muscolare da larve di cestodi Trypanorincha in pesce spada (Xiphia gladius)*. *Atti SISVET* 47: 765-767.
- 6) Panebianco A., Giannetto S. (1994): *Osservazioni sull'infestazione da Maccalumtr ema Xiphias (Yamaguti, 1970) in Xiphias Gladius*. *Argomenti di Patologia Veterinaria* ed. Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche, 36: 243-251
- 7) Pellegrini N, Taccini E., Macri B., Panebianco A., Ghelarducci L. e Gori S. (1984): *Su alcuni casi di infestazione da Molicola horridus in Molidi (Mola Mola): Reperti anatomo-istopatologici e considerazioni patogenetiche*. *Annali Fac. Med. Vet. di Pisa.*, 36 :177-181.
- 8) Pellegrino C., Julini M, Bertolotti P., Ajmerito P. (1987). *Industrie alimentari*, 26: 227-232.

# DERMATOPATOLOGIA COMPARATA DEI TELEOSTEI

MANERA M., BIAVATI S.

*Istituto di Patologia Generale e Anatomia Patologica Veterinaria, Bologna*

## RIASSUNTO

Il tegumento dei teleostei, pur essendo strutturalmente assimilabile a quello di qualsiasi altro vertebrato, presenta delle caratteristiche anatomico-funzionali che le sono proprie. Si differenzia in modo particolare nell'epidermide che è mucogenetica. Analogamente le modalità reattivo-difensive del tegumento presentano alcuni aspetti peculiari. E' stata quindi elaborata una tabella volta a valutare l'equivalenza tra lesioni istologicamente dimostrabili nel tegumento dei teleostei a quelle rinvenibili nei mammiferi.

## SUMMARY

The teleosts integument is structured like that of other vertebrates but presents some anatomic and functional features, mainly in its upper stratum, the epidermis which is mucogenic. Likewise the defensive and reactive integument patterns display particular aspects. So a table was drawn in order to compare the histologic integument lesions of teleosts with those of mammalian.

## INTRODUZIONE

Al pari di ogni vertebrato i teleostei (osteitti o pesci ossei) possiedono un tegumento costituito da cute o da "annessi"<sup>1</sup> cutanei. Pur essendo la struttura

---

1) In questa sede il termine di "annessi cutanei" viene usato impropriamente, dal momento che, tradizionalmente, con questo termine si designano le produzioni epidermiche (peli ed unghie nei mammiferi) che non trovano un diretto riscontro nei teleostei. Col termine di "annessi cutanei" intendiamo, in questa sede, le diverse specializzazioni e produzioni della cute, nella sua porzione epidermica (ghiandole pluricellulari, fotofori) e dermica (squame cicloidi e etenoidi). Si noti, per inciso, che nei pesci cartilaginei la squama di tipo placode è nella sua porzione più esterna costituita da smalto di derivazione cetodermica (epitelio adamantino). L'istogenesi di questo tipo di squama presenta delle analogie con l'istogenesi dei denti dei vertebrati.

cutanea dei teleostei assimilabile per conformazione a quella di qualsiasi altro vertebrato - consta di una epidermide, un derma ed un ipoderma - presenta delle caratteristiche peculiari di questo raggruppamento tassonomico - con notevoli variazioni specie-specifiche - che rappresentano l'adattamento di questi esseri viventi al loro *habitat* acquatico.

L'epidermide dei teleostei - anche chiamata nell'anguilla mucosa epidermica (Saglio et al., 1988) od epidermide mucogenetica (Leonard e Summers, 1976) - presenta probabilmente le maggiori modificazioni adattative richiamando, a motivo dell'abbondante secrezione mucosa, le mucose dei vertebrati.

Peculiari sono, quindi, le modalità reattivo-difensive del tegumento dei teleostei con aspetti tipicamente rinvenibili, non solo a carico dell'epidermide dei mammiferi, ma anche a carico delle mucose dei vertebrati (Manera, 1992).

#### CENNI DI STRUTTURA DEL TEGUMENTO DEI TELEOSTEI

Si è già accennato al fatto che il tegumento, od apparato tegumentario, dei teleostei consti di una cute e dei relativi "annessi" cutanei, che nei teleostei di interesse veterinario sono, fondamentalmente, rappresentati dalle squame. Altre specializzazioni cutanee rinvenibili nei teleostei sono ghiandole produttrici di veleno, fotofori, ghiandole adesive, ecc... (Nicol, 1969, Patt e Patt, 1969, Yokote, 1982).

L'epidermide dei teleostei, oltre a scernere mucina (mucine neutre, ed acide quali sialo- e solfomucine) ad opera delle cellule mucose - assimilabili a cellule caliciformi - e delle cellule epiteliali superficiali, è caratterizzata dal fatto di essere mitoticamente attiva ad ogni livello, pur essendolo maggiormente a livello di strato soprabasale (Kranz et al., 1980, Manera e Biavati, 1994). Perciò le cellule epiteliali, anche dette *contenenti filamenti* a motivo dell'abbondanza in filamenti intermedi di citocheratine (Manera, 1992; Manera e Biavati, 1994), vengono chiamate malpighiane<sup>2</sup> indipenden-

---

2) Nei mammiferi l'epidermide è formata, dal basso verso l'alto, da uno strato basale o germinativo, da uno strato spinoso, da uno strato granuloso, da uno strato lucido - presente nelle zone prive di peli - e da uno strato corneo che desquama nella porzione più esterna. L'insieme costituito dallo strato basale o germinativo e da quello spinoso prende il nome di strato malpighiano ed è caratterizzato da numerose figure mitotiche. Perciò l'aggettivo "malpighiane", riferito alle cellule epidermiche dei teleostei è volto a sottolineare le capacità mitotiche delle stesse, non, quindi, l'appartenenza ad uno strato malpighiano. Infatti alla luce del fatto che le cellule epidermiche dei teleostei sono mitoticamente attive ad ogni livello, l'epidermide intera dei teleostei dovrebbe essere assimilata ad uno strato malpighiano.

temente dallo strato di appartenenza. L'epidermide consta, infatti, di tre strati: basale, intermedio, superficiale. Lo strato basale è costituito da cellule epiteliali prismatiche alte specializzate nella giunzione alla membrana basale sottostante; quello intermedio - comprendente il c.d. strato soprabasale - è costituito da cellule malpighiane costituenti un reticolo nel quale si rinven- gono cellule mucose, cellule clavate, cellule granulari eosinofile, melanofori, macrofagi contenenti melanina, leucociti, cellule dendritiche, cellule a cloruri - queste categorie sono variamente rappresentate a seconda della specie, del sesso, dell'età, dello stato fisiologico, parafisiologico, patologico (Manera, 1992); quello superficiale è costituito da cellule epiteliali squamose ed in alcuni pesci ed in particolari distretti anatomici secernono la c.d. cuticola, secrezione glicoproteica di aspetto fibroso all'ultrastruttura (Whitear e Mittal, 1984), impropriamente assimilata dai più allo strato mucoso che riveste l'epi- dermide di qualsiasi teleosteo.

Il derma si compone di due porzioni: un derma lasso, immediatamente al di sotto della membrana basale dermo-epidermica, contenente le tasche delle squame costituito da tessuto connettivo lasso; un derma compatto, al di sotto del primo e sopra l'ipoderma, costituito da tessuto connettivo compatto, con fibre collagene parallele tra loro ed alla superficie e fibre trasversali di anco- raggio alla membrana basale. In letteratura vi è un po' di confusione circa la localizzazione reciproca di questi tessuti - Stoskopf (1993) riporta il derma compatto sovrastante quello lasso, Patt e Patt (1969), riferendosi ai ciclostomi, parla di un derma comprendente uno strato fibroso esterno ed uno composto da cellule adipose "areolari" interno - è ciò è verosimilmente lega- to alle notevoli differenze interspecifiche - in alcuni pesci non vi è netta di- stinzione tra i due tipi di derma - ed alla presenza nei pesci di un ipoderma povero in cellule adipose e ricco in fibre collagene con l'aspetto di tessuto connettivo lasso sovrapponibile ad un derma lasso.

L'ipoderma dei teleostei, non svolgendo funzioni metaboliche nei con- fronti dei lipidi, non ha l'aspetto del pannicolo adiposo dei mammiferi, pos- sedendo, invece, una struttura connettivale lassa con voluminosi adipociti interposti.

## CENNI SULLE MODALITÀ REATTIVO-DIFENSIVE DEL TEGUMENTO DEI TELEOSTEI

I vari tessuti che compongono l'apparato tegumentario dei teleostei sono in grado di reagire e difendersi da vari tipi di aggressione, ad opera di meccanismi in comune con l'apparato tegumentario degli altri vertebrati ed in parte propri dei teleostei. Più interessante da questo punto di vista sono i meccanismi reattivo-difensivi espressi dall'epidermide mucogenetica.

In linea di massima ogni tipo cellulare che entra a far parte di quel complesso reticolo dinamico che è l'epidermide dei teleostei è in grado di manifestare iperplasia. Si repertano, quindi, iperplasie o, comunque, aumento di numero (per accorsa dal sottostante derma) delle cellule malpighiane, delle cellule mucose, della componente leucocitaria autoctona e di derivazione dermica, dei melanofori. L'iperplasia delle cellule mucose, una sorta di metaplasia mucosa, può essere accompagnata da discrinie con modificazione chimica del secreto mucoso e rappresenta una generica reazione a stimoli irritativi chimico-fisici. Con la persistenza dello stimolo irritativo si assiste, di norma, a più profonde modificazioni epidermiche, con iperplasia delle cellule malpighiane e riduzione di quelle mucose. Questi aspetti sottolineano la plasticità dell'epidermide dei teleostei in grado di modulare le proprie popolazioni cellulari in relazione agli stimoli cui può andare incontro ed hanno suggerito il termine di "reticolo dinamico"<sup>3</sup> riferito alla stessa epidermide (Manera, 1992).

L'epidermide manifesterebbe una spiccata immunità locale ancora poco conosciuta e denunciata da una polimorfa popolazione leucocitaria residente, ed una attiva sintesi anticorpale. I teleostei possiedono, inoltre, un

---

3) Tale reticolo dinamico disporrebbe di due interfacce. La più superficiale è rappresentata dallo strato epiteliale superficiale con le sue produzioni mucose e/o cuticolari e media gli scambi con l'ambiente acquatico; la più interna è rappresentata dallo strato basale e dalla sottostante membrana basale e media gli scambi con il sottostante derma. Qualsiasi variazione di queste due interfacce si ripercuote, in cascata, sul reticolo dinamico, cosicché queste interfacce possono essere utilizzate come veri e propri indici della sofferenza del reticolo epidermico. Mentre nei mammiferi la necrobiosi delle cellule epidermiche è accompagnata da modificazioni dell'espressione dei glicconiugati di membrana, con reattività particolari per ogni strato, ciò non si riscontra nei teleostei, perlomeno nell'anguilla (Manera, 1992). La monotona espressione dei glicconiugati di membrana cambia, nei teleostei, a livello di strato più superficiale, a sottolineare l'importanza del glicocalice (cell coat) nella biologia cellulare e la specializzazione dello strato più superficiale nel mediare i critici rapporti con l'ambiente acquatico (Manera, 1992). Lo strato basale è anch'esso oltremodo specializzato nel senso di garantire l'adesione, per il tramite della membrana basale, al derma sottostante, ma, nell'anguilla non si discosta istochimicamente dallo strato intermedio (Manera, 1992). Solo più approfonditi studi istochimici, immunostochimici, immunocitochimici ed ultrastrutturali permetteranno di capire più a fondo e nei vari aspetti la biologia dell'apparato tegumentario dei teleostei.

polimorfo repertorio di difese umorali aspecifiche rappresentato da proteina C reattiva, lisozima, tripsina, dal complemento (via alternativa), da agglutinine, lisine, precipitine, transferrina, ceruloplasmina, metallotioneina, interferone (Ingram, 1980, Alexander e Ingram, 1992). Molte di queste sostanze si rinvencono a livello di muco epidermico (Ingram, 1980). Viene di seguito riportata una tabella comparativa fra le lesioni istologicamente rinvenibili a livello cutaneo sia nei mammiferi che nei teleostei con le varianti che quest'ultimi manifestano. Non vengono riportate le lesioni che, presenti nei mammiferi, non trovano riscontro né per analogia, né per omologia, né per assimilazione nei teleostei.

TABELLA DI EQUIVALENZA (PER ANALOGIA, OMOLOGIA O PER SEMPLICE ASSIMILAZIONE) TRA LE ALTERAZIONI ISTOLOGICHE CUTANEE DEI MAMMIFERI E QUELLE DEI TELEOSTEI

(Dedotta da Ferguson, 1989 e da Muller et al., 1989)

	MAMMIFERI	TELEOSTEI
EPIDERMIDE	Ipercheratosi.	C.d. iperplasia della cuticola con o senza metaplasia mucosa. In condizioni parafisiologiche nei maschi dei ciprinidi nel periodo riproduttivo con precise localizzazioni: tubercoli nuziali.
	Discheratosi.	Discrinia <sup>4</sup> (shift da sialo a solfomucine). Metaplasie squamose e mucose.
	Iperplasia (regolare, irregolare, papillata, pseudocarcinomatosa)	Iperplasia delle cellule epidermiche (regolare, papillata, pseudocarcinomatosa); iperplasia delle cellule mucose (metaplasia mucosa), iperplasia della popolazione leucocitaria residente.
	Ipoplasia e atrofia.	Frequente l'iperplasia dello strato soprabasale e di quello intermedio (assimilabile all'acantosi dei mammiferi).

4) In questa sede non si vuole affermare che la discheratosi, imperfetta od anormale cheratinizzazione dei cheratinociti dei mammiferi, corrisponda funzionalmente alla discrinia della mucosa epidermica dei teleostei. Infatti, mentre quest'ultima rappresenta una risposta di norma adattativa a stimoli irritativi di varia natura, la prima rappresenta una risposta disadattativa (difetto della progressione necrobiotica dei cheratinociti) che si accompagna a diverse dermatosi infiammatorie. Si tratta di una semplice assimilazione derivante dall'ipotetica proporzione ipercheratosi: iperplasia della cuticola = discheratosi: discrinia. Probabilmente, la presunta metaplasia squamosa dei teleostei si avvicina di più, funzionalmente parlando, alla discheratosi dei mammiferi. Infatti anche in questo caso si assiste ad un'alterazione della normale struttura epidermica nelle parti più superficiali per alterata maturazione degli elementi cellulari in essa contenuti.

Necrosi.	Ipoplasia ed atrofia.
Spongiosi (edema intercellulare).	Necrosi. Spongiosi. Molto frequente ed accompagna invariabilmente le alterazioni della barriera osmotica, nonché le forme dermatitiche con infiltrazione epidermica.
Degenerazione idropica (edema intracellulare).	Degenerazione idropica. E' indice di gravi alterazioni della barriera osmotica.
Acantolisi.	Acantolisi. Si reperta anche frequentemente la perdita di adesione delle cellule basali con la sottostante membrana basale con formazione di lacune. A seguito di spongiosi si rinvengono frequentemente vescicole al di sopra o nell'ambito dello strato basale.
Esocitosi.	Esocitosi di elementi eritrocitari, leucocitari dal sottostante derma formanti anche delle micro-raccolte.
Microvescicole, vescicole, bolle.	Microvescicole, vescicole, bolle. A seguito di acantolisi, spongiosi, degenerazione idropica. Le bolle tendono facilmente all'erosione.
Iperpigmentazione.	Di norma l'iperpigmentazione coinvolge maggiormente i melanociti dermici. Istologicamente si può, comunque, osservare in talune situazioni patologiche un aumento della popolazione di melanofori in sede epidermica. Inoltre si possono repertare macrofagi repleti di melanina in questa sede.
Ipopigmentazione.	L'ipopigmentazione si riscontra a carico dei melanofori dermici.
Crosta	L'analogo della crosta è rappresentato dalla c.d. iperplasia della cuticola con l'incorporazione di detriti cellulari, e di altra origine (materiale in sospensione nell'acqua, patogeni, essudati).

## DERMA

Patologie a carico del collagene  
Fibroplasia, fibrosi, sclerosi.

Nei teleostei si riscontrano: atrofie, distrofie, calcificazioni, degenerazioni. Le dermatiti croniche sono caratterizzate da abbondante tessuto di granulazione reticolo-istiocitario e fibrovascolare e quindi si repertano i quadri di fibroplasia e fibrosi. A motivo delle notevoli capacità rigenerative dei tessuti dei teleostei minore, anche se presente, è il fenomeno di riparazione

Papillomatosi.	per granulazione con la formazione finale di tessuto cicatriziale (sclerosi). Papillomatosi. Si riscontra in corso di processi neoplastici e iperplastici dell'epidermide e flogistici a carico del derma.
Incontinenza pigmentaria.	Le cellule dei teleostei contenenti pigmenti melanici o pseudo-melanici (melanociti, melanofori, melanomacrofagi) presentano la caratteristica di degranulare in risposta a diversi stimoli patogeni e "stressogeni".
Edema.	L'edema dermico può avere nei teleostei una duplice origine. Qualsiasi alterazione della barriera osmotica di pesci dulciacquicoli comporta, per gradiente osmotico, l'imbibizione del derma da parte di acqua. Per fenomeni flogistici, ma anche di mancato drenaggio linfatico si può avere trasudazione/essudazione. Nei teleostei la linfa drenante dal muscolo e dalla cute supera, per volume, di quattro volte la massa ematica ed, inoltre, la linfa dermica rappresenta l'80% di quella.
Degenerazione mucosa, mucoide, mixoide.	Isole di tessuto mixoide sono state descritte in corso di fibromi e fibromixomi e caratterizzano i mixomi.
Patologie a carico dei vasi.	Nei teleostei si rinvengono: ectasie, degenerazioni endoteliali (degenerazione idropica), ialinizzazione, necrosi fibrinoide, vasculiti, trombosi, emorragie.

## IPODERMA

L'ipoderma dei mammiferi (sottocute, pannicolo adiposo) manifesta le patologie del collagene e vascolari descritte per il derma con in più le patologie infiammatorie e necrotiche che gli sono proprie senza il coinvolgimento delle strutture sovrastanti.

L'ipoderma dei teleostei è alquanto diverso da quello dei mammiferi, non svolgendo questo tessuto importanti funzioni nel metabolismo lipidico. Sulla componente adipocitica prevale una componente connettiva-lassa. A motivo dell'abbondante vascolarizzazione, l'ipoderma è sede di processi flogistici acuti e cronici, normalmente associati a patologie dermiche o muscolari.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Alexander J.B. e Ingram G.A. (1992). *Noncellular nonspecific defence mechanisms of fish*. Annual Rev. of Fish Diseases, 2: 249-279.
- 2) Ferguson H.W. (1989). *Skin*. In Systemic pathology of Fish. A text and atlas of comparative tissue responses in diseases of teleosts (edito da Ferguson H.W.), pp 41-63. Ames. Iowa State University Press.
- 3) Ingram G.A. (1980). *Substances involved in the natural resistance of fish infection. A review*. J. Fish Biol., 16: 23-60.
- 4) Kranz H., Peters N., Breshing G., Stich H.F. (1980). *On cell kinetics in skin tumors of the Pacific English sole Parophrys vetulus Girard*. J. Fish Dis., 3: 125-132.
- 5) Leonard J.B. e Summers R.G. (1976). *The ultrastructure of the integument of the american eel, Anguilla rostrata*. Cell Tiss. Res., 171: 1-30.
- 6) Manera M. (1992). *Il tegumento di Anguilla anguilla L in condizioni normali e patologiche*. Contributo sperimentale. Tesi di laurea in Medicina Veterinaria. Università degli Studi di Bologna.
- 7) Manera M. e Biavati S. (1994). *An immuno-histochemical technique used to demonstrate the transition form of a squamous cell carcinoma in a mirror carp, Cyprinus carpio L.* J. FishDis., 17: 93-96.
- 8) Muller G.H., Kirk R.W., Scott D.W. (1989). *Dermohistopathology*. In Small animal dermatology (edito da Dyson J.), pp 49-91. Philadelphia. W.B. Saunders Company.
- 9) Nicol J.A.C. (1969). *Bioluminescence*. In fish physiology (edito da Hoar W.S. e Randall D.J.). Vol III, pp 355-400. London. Academic Press.
- 10) Patt D.J. e Patt G.R. (1969). *The integument*. In Comparative vertebrate histology, pp 111-145. New York. Harper & Row Publishers.
- 11) Saglio PH., Escaffre A.M., Blanc J.M. (1988). *Structural characteristics of the epidermal mucosa in yellow and silver european eel, Anguilla anguilla L.* J. Fish Biol., 32: 505-514.
- 12) Stoskopf M.K. (1992). *Fish histology*. In Fish medicine (edito da Stoskopf M.K.), pp 31-47. Philadelphia. Saunders.
- 13) Whitcar M. e Mittal A.K. (1984). *Surface secretions of the skin of Blennius (lipophrys) pholis L.* J. Fish Biol., 5: 317-331.
- 14) Yokote M. (1982). *Skin*. In An atlas of fish histology. Normal and pathological features (edito da Hibiya T.), pp 8-15. Tokio. Kodanha Ltd. Distribuito fuori dal Giappone da Gustav Fischer Verlag, Stoccarda.

# MODIFICAZIONI POSTMORTALI DEI TELEOSTEI

BIAVATI S.

*Istituto di Patologia Generale e Anatomia Patologica Veterinaria, Bologna*

La parola necropsopia indica una serie sistematica di operazioni che il tecnico professionista esegue sull'organismo privo di vita, con lo scopo di rilevare le alterazioni tissutali presenti in esso, per stabilire la causa della morte, dopo aver compiuto un'osservazione tanatologica, cioè precisata la cronologia dei fenomeni abiotici. Evidentemente questa definizione si applica nell'esecuzione di un esame necroscopico nei mammiferi ed ha un duplice scopo: riscontro diagnostico e indagine medico-legale. Nelle piccole specie e nei pesci d'allevamento, in particolare, la necropsopia viene impiegata anche per fini diagnostici e terapeutici. In quest'ultimo caso i pesci sono vittime di una morte improvvisa e in buono stato di salute, eccezion fatta per soggetti colpiti in vita da malattie di ogni tipo, quindi è necessario conoscere la tecnica autoptica e soprattutto sapere eseguire un esame tanatologico indispensabile per formulare una diagnosi anatomico-patologica e/o un giudizio di tipo ispettivo e igienico sanitario. Per l'esecuzione di un esame autoptico nel pesce considereremo con estremo interesse i fenomeni abiotici consecutivi, conservativi e trasformativi, del tutto sovrapponibili a quelli che si manifestano nei mammiferi. Nel pesce, rispetto ai mammiferi, i fenomeni post-mortali compaiono e scompaiono più velocemente rispettando la stessa cronologia. Detti fenomeni come nei mammiferi sono condizionati da: stress, temperatura, agenti chimici e batterici e la loro manifestazione avviene nello stesso ordine cronologico descritto per gli animali e l'uomo. Non deve meravigliare il termine necropsopia applicato nell'esecuzione di un esame accurato di un pesce, questo si deve interpretare come esame autoptico in positivo o meglio esame necroscopico eseguito in soggetti sani, oppure, per fini diagnostici, in soggetti malati ancora in vita e sacrificati sul tavolo anatomico. Il sacrificio dei pesci sani o malati da esaminare, dal punto di vista anatomico-patologico, deve essere fatto immediatamente prima di eseguire la necropsopia perchè a temperatura ambiente i fenomeni litici in alcune specie iniziano entro i primi 10 minuti dopo la morte. Prima di iniziare l'esame

necroscopico di un soggetto negli animali domestici è necessario eseguire il segnalamento e conoscere il nome del proprietario dell'animale. Nei pesci è necessario conoscere la specie, il luogo in cui sono stati allevati o pescati e se sono di importazione, conoscerne la provenienza. Ognuno di questi dati ha valore ai fini dell'esame autoptico. Ci sono malattie o zoonosi proprie di determinate specie o che colpiscono prevalentemente determinate specie come ad es. Anisakidosi nei pesci azzurri, anguillicosi nell'anguilla e tubercolosi nei tonni. Ci sono pesci provenienti dai mari tropicali che in certi periodi dell'anno sono velenosi. Eseguito detto segnalamento si procede quindi all'esecuzione di uno o più esami necroscopici in soggetti scelti dal medico veterinario con oculatezza e professionalità. L'ordine da seguire nel praticare un esame autoptico è il seguente: esame estemo del pesce, palpazione delle masse muscolari e dell'addome, esame interno e infine prelevamento dei pezzi per esami di laboratorio (strisci a fresco, colorati con metodi nucleoplasmatici, esami batteriologici, biologici, istologici, chimici, TEM). L'eventuale conservazione dei tessuti in azoto liquido non permette un'agevole esecuzione di esami istologici o istochimici.

#### *ESAME ESTERNO:*

Si inizia osservando e descrivendo i caratteri generali del corpo del pesce con un esame obiettivo generale: colore del tegumento e delle scaglie se presenti, conformazione generale dello scheletro, consistenza dei muscoli e di massima importanza è, verificare l'odore del prodotto in esame. Si procede quindi all'esecuzione di un esame obiettivo particolare: capo, dorso, addome, orifizi esterni, cavità branchiale, branchie, occhi e pinne. Durante queste osservazioni si debbono considerare e rilevare i seguenti fenomeni abiotici consecutivi: rigidità cadaverica, autolisi, evaporazione, tensione del bulbo oculare e macchie ipostatiche addominali. La comparsa della rigidità cadaverica è strettamente connessa con i fenomeni biochimici che si susseguono dopo la morte dei pesci, molto simili a quelli che si manifestano nei muscoli dei mammiferi commestibili:

1. Esaurimento delle riserve energetiche del muscolo, in particolare dell'ATP.
2. Formazioni di legami irreversibili tra actina e miosina.

3. Abbassamento del pH a valori prossimi al P.I.(punto isoelettrico) delle proteine, sia per accumulo di acido lattico, che per la presenza di ioni H provenienti dall'idrolisi dell'ATP. Al P.I. le proteine perdono la capacità di ritenzione idrica.
4. Liberazione di ioni Ca dal reticolo sarcoplasmatico e dagli enzimi lisosomiali, che avviano le reazioni autolitiche.

Merita una particolare descrizione la degradazione post-mortale dei carboidrati. Nei mammiferi e in particolare nel muscolo del coniglio, pare agiscano due alfa amilasi e tre glucosidasi capaci di degradare il glicogeno. Le alfa amilasi degradano il glicogeno a oligocassaride e le glucosidasi farebbero degradare quest'ultimo in glucosio. Può essere che altri tipi di glucosidasi agiscano direttamente sul glicogeno per trasformarlo in glucosio. Nei muscoli dei pesci invece la degradazione idrolitica del glicogeno non è nota in quanto è un fenomeno che avviene in modo molto più complesso che nei mammiferi. Infatti ricerche eseguite con glicogeno radioattivo hanno dimostrato che nei muscoli dei pesci operano dei meccanismi fosforolitici e idrolitici che non determinano evidenti variazioni muscolari. Ne consegue che questo capitolo di interesse enzimologico rimane completamente da chiarire per quanto riguarda la demolizione enzimatica post-mortale del glicogeno presente nei muscoli dei pesci.

Il pesce appena pescato ha consistenza soda e presenta una certa flessibilità che scompare in tempi rapidi per il sopraggiungere della rigidità cadaverica. Questa si manifesta con il graduale irrigidimento di tutti i muscoli, è un'onda che inizia dai muscoli masseteri e percorre longitudinalmente tutto il corpo dell'animale fino alla pinna caudale. Dopo un certo tempo di rigidità totale questa si dissolve a partire dagli stessi muscoli dai quali è iniziata, ed è molto evidente nei pesci di piccola taglia, mentre nei pesci lunghi è meno apprezzabile. Nei pesci di pregio congelati o surgelati è possibile a volte constatare la rigidità cadaverica all'atto dello scongelamento. In questo caso il fenomeno ha breve durata. Evidentemente è necessario precisare che il rigor mortis come si manifesta nei mammiferi compare solo nei pesci piatti, perché nei pesci rotondeggianti (sgomberi, alici, sarde, naselli ecc.) la rigidità cadaverica compare nello stesso momento in tutto il corpo e si manifesta come un rassodamento uniforme. In queste specie il fenomeno si risolve iniziando dai muscoli della testa verso i muscoli della pinna caudale dove persiste per molto tempo. L'evaporazione dei liquidi interstiziali e corporei

in un organismo privo di vita è dipendente dalla temperatura esterna e dalla ventilazione. Nei mammiferi la temperatura corporea svela il periodo di tempo trascorso dopo la morte, perché abbassandosi, dopo 36 ore, al massimo, uguaglia la temperatura ambiente. Nel pesce che durante la vita ha la stessa temperatura dell'acqua in cui vive e quindi una temperatura spesso più bassa dell'ambiente aria, nel momento in cui viene pescato, passa ad una temperatura ambiente maggiore, di conseguenza i fenomeni di evaporazione si manifestano più velocemente. Detti fenomeni avvengono anche se il pesce viene conservato ad una temperatura di 3-5°C. Più è bassa la temperatura ambiente che accoglie il pesce più il rigor compare con maggior precocità. Infatti negli sgomberi conservati a 2-3°C nel 50% dei casi il rigor compare dopo 10', mentre a temperatura ambiente di 24°C la rigidità è completa in tutti i soggetti dopo 2 ore. Col trascorrere del tempo la pelle diviene secca e al tatto, specie nei condroitti, scivola sul muscolo sottostante. A causa dell'evaporazione spesso nei pesci azzurri la pelle si rompe a livello addominale aprendo così una porta di ingresso ai batteri terribili di irruzione ambientale.

### *ESAME DELL'OCCHIO*

Normalmente l'occhio del pesce appena pescato si mostra brillante, lucente, convesso con globo oculare teso. Detti caratteri permangono per 24-48 ore a 3°C. Col passare del tempo, dopo la morte, anche se il pesce è conservato in ambiente a bassa temperatura, compare una velatura, poi con l'evaporazione il globo oculare perde tensione e diviene opaco e infine con la putrefazione l'occhio diviene concavo e mostra per trasparenza delle macchie nere (macchie di Sommer dei mammiferi) ed è ricoperto da una patina mucosa grigiastra. In questo momento sono trascorsi sette giorni dalla morte e il pesce, pur conservato ad una temperatura di 3-5°, è in avanzato stato di putrefazione. È necessario ricordare che i pesci congelati o surgelati debbono mostrare l'occhio con bulbo teso e di colore bianco opaco che rimane tale anche dopo l'avvenuto scongelamento del pesce. Infatti per legge il pesce deve essere congelato freschissimo, quindi l'occhio deve essere ancora ripieno di liquido endo-oculare.

### *ESAME DELL'ADDOME*

Lo stato di incipiente putrefazione si può verificare anche notando delle macchie blu verdi nella regione addominale che corrispondono alle *macchie*

*ipostatiche*. Sono un segno abiotico molto importante nei mammiferi e possono indicare l'avvenuto spostamento del cadavere. Nei pesci sono macchie rosso-verdastre che compaiono nell'addome depigmentato e sono prodotte dai fenomeni litici intestinali. L'intestino è a contatto con la parete addominale. Con la risoluzione del rigor mortis inizia nel pesce il periodo della frollatura, cioè si accentuano i fenomeni trasformativi postmortali. Sono fenomeni molto rapidi che a 3°C si manifestano dalle 5 alle 30 ore dopo la morte.

### ESAME DEL MUSCOLO

L'abbassamento del pH nelle masse muscolari è minore che nei muscoli degli animali da macello da 7 a 6,2. Ciò conferisce al muscolo del pesce una maggiore instabilità microbiologica. Le reazioni enzimatiche a carico dei numerosi composti azotati non proteici e dell'acido lattico, iniziano precocemente rendendo i caratteri organolettici, col passare del tempo, sempre più scadenti. I principali responsabili della putrefazione sono i microrganismi presenti sulla cute, sulle branchie e nell'intestino, i quali, risolta la rigidità cadaverica e venute meno le difese naturali del pesce, si moltiplicano ed iniziano a invadere i tessuti. I fenomeni autolitici sono abatterici e hanno importanza marginale nella putrefazione. Un particolare fenomeno catabolico che avviene dopo la morte è la conversione autolitica e batterica dell'ATP in ipoxantina, con formazione di ammoniaca. La determinazione dell'ipoxantina costituisce uno dei più validi indici di freschezza del pesce. Gradualmente l'aspetto dell'animale da brillante diventa opaco, l'occhio da vivo a vitreo diviene opaco, le branchie cambiano di tonalità di colore, da rosso vivo a rosso-marrone poi rosso-verdastro.

L'**ODORE** (segno abiotico sensoriale molto importante) varia da gradevole di fresca salsedine a quello acre di pesce che si acutizza sempre di più. Infatti l'esame visivo e tattile deve essere integrato da quello olfattivo. Certo è un esame professionalmente poco estetico e quindi andrebbe eseguito nel caso in cui gli altri esami lascino dei dubbi nel giudicare la freschezza del pesce. Il vero e proprio odore di pesce si percepisce dopo 24 ore dalla morte: inizialmente è tenue, poi sempre più acuto e così rimane per 5-6 giorni se il pesce è stato conservato in condizioni ottimali. Insorgono successivamente altri odori sgradevoli che vanno dal semplice odore stantio al fecaloide passando attraverso una gamma di odori indicati come: acido dolce, di frutta, frescume, di fieno, ammoniacale, ecc. Evidentemente col comparire dei sud-

detti odori il pesce non può più considerarsi commestibile. Le reazioni putrefattive vere e proprie iniziano in questo momento, ma il valore commerciale del pesce è ormai diminuito. L'invasione microbica delle masse muscolari è in rapporto alla carica microbica iniziale (secondo alcuni dati sul pesce fresco sono presenti da  $10^3$  a dieci<sup>7</sup> batteri per  $\text{cm}^2$  di superficie oppure per ogni grammo di contenuto intestinale), è in rapporto al modo e alla durata di conservazione e viene rallentata dalle basse temperature. Nelle specie grasse (pesce azzurro, salmone, ecc.) si sovrappongono fenomeni di irrancidimento a carico dei lipidi spesso insaturi. L'irrancidimento avviene anche a basse temperature ed è il principale problema del pesce refrigerato durante i primi giorni di conservazione, prima che i fenomeni putrefattivi abbiano il sopravvento. L'irrancidimento avviene progressivamente anche nel pesce congelato e surgelato. L'ossidazione dei lipidi può interessare anche il pesce magro parzialmente toelettato (eviscerato, in filetti e decapitato) a causa della facile penetrazione dell'ossigeno nei tessuti. I sistemi enzimatici microsomiali, in presenza di ferro, catalizzano, la perossidazione dei grassi; detto fenomeno pertanto avviene più rapidamente nei muscoli rossi che nei bianchi. Per accertare lo stato di freschezza del pesce, prima di ricorrere ad analisi chimiche e batteriologiche che richiedono molto tempo per l'esecuzione si deve eseguire un vero e proprio esame autoptico per rilevare con metodo tutte le modificazioni post-mortali che si susseguono nel tempo onde poter esprimere una valutazione tecnico-sensoriale che è rapida e di facile esecuzione. Si tratta dunque di eseguire metodologicamente un protocollo di indagine che non può essere eseguito diligentemente da chi non conosca la tecnica autoptica e la diagnostica cadaverica del pesce. Il protocollo di indagine è riportato nella tabella 22.2, valida per tutti i Paesi membri della CEE (Reg. 33/89) che suddivide in base alla freschezza i pesci in quattro categorie di cui solo le prime tre ammesse al commercio. Per l'ammissione al consumo dei soggetti appartenenti alle tre categorie ammesse al commercio è sempre necessario eseguire un esame necroscopico applicando quelle manualità e quei rilievi che solo la tecnica necroscopica può fornire.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Amlacher E. (1961). *Taschenbuch der Fischkrankheiten*. Jena. Gustav Fischer Verlag.
- 2) Cappelli P., Vannucchi V. (1990). *Chimica degli alimenti, conservazione e trasformazione*. Zanichelli, Bologna.
- 3) Pellegrino C. e Tortonese E (1982). *Pesci marini e prodotti alimentari derivati*. Bologna. Edagricole.

# PATOLOGIA DEGLI ORGANI DI MOVIMENTO DEL CAVALLO

## (Le fratture delle ossa lunghe)

MASETTI L.\*, JOECHLER M.\*\*

*\* Istituto di Patologia Speciale e Clinica Chirurgica Veterinaria, Bologna*

*\*\* Ricercatore e Dottorando di Ricerca in Ortopedia degli animali domestici*

### INTRODUZIONE:

Turner, McIlwraith e Stashak, nella IVa edizione dell' "ADAMS' LA ZOPPICATURA NEI CAVALLI" di Ted S.Stashak (1990), trattano della patologia degli organi di movimento in tre capitoli per un totale di 486 pagine. Questi Autori, fra le righe, si dicono convinti di non avere comunque trattato l'argomento nella sua completezza.

Micheletto (1980), a proposito delle malattie chirurgiche degli apparati e dei sistemi, alla Sez.I - apparato locomotore -, suddivide l'argomento nei seguenti cinque capitoli:

- 1) patologia del tessuto osseo e delle ossa;
- 2) patologia del disco epifisario;
- 3) patologia delle articolazioni;
- 4) patologia dei tendini e delle guaine sinoviali;
- 5) patologia dei muscoli.

E' evidente quindi che in questa sede non sia possibile affrontare la patologia degli organi di movimento nella sua totalità, seppure succintamente, ma sia necessaria la scelta di un tema circoscritto e trattarlo, nei limiti del possibile, in maniera più approfondita.

Abbiamo preferito l'argomento delle fratture, poichè presso la Clinica Chirurgica Veterinaria di Bologna, negli ultimi anni, è stato sviluppato un Piano di Ricerca sulla "osteosintesi delle fratture delle ossa lunghe del cavallo".

Ciò è stato possibile grazie all'evoluzione delle tecniche ortopediche di fissazione interna ed esterna o combinate (Fackelman 1982, Brooker 1979), finalizzate alla guarigione (cicatrizzazione) per prima intenzione tramite un

processo di ossificazione di tipo Haversiano (Barone 1974, Micheletto 1980) e grazie ai progressi della Anestesiologia Veterinaria (Auer 1992).

### *PATOLOGIA:*

La frattura rappresenta una alterazione anatomica (Mensa 1942, Micheletto 1980) in seguito ad un evento traumatico; quest'ultimo costituisce la causa diretta o secondaria a fattori predisponenti. E' noto come infatti in seguito ad un trauma, più o meno violento, possano manifestarsi alterazioni anatomiche e funzionali. Il meccanismo patogenetico si estrinseca tramite forze che vengono esercitate sul segmento o sui segmenti ossei per "torsione", "compressione", "flessione", "rotazione", "distensione" e "associazione di una o più delle succitate componenti". Quali fattori predisponenti vengono citati: osteodistrofie, alterazioni ormonali, somministrazione indiscriminata di farmaci, età, processi infiammatori, cisti, neoplasie, surmenage cronico, ecc.. Altri fattori, quali l'anatomia funzionale degli arti, il tipo di andatura in rapporto al lavoro svolto, la conformazione - attitudine, l'allenamento a cui viene sottoposto il soggetto, che rendono l'animale adatto al lavoro da svolgere, rappresentano quella somma di "fattori intrinseci" al soggetto stesso, che lo rendono più o meno passibile degli effetti del trauma. Esistono anche dei "fattori estrinseci", che possono influire sulla patogenesi dell'evento, da soli o concomitanti ai precedenti. Tra questi sono considerati la natura e il tipo di terreno su cui viene svolto il lavoro e le caratteristiche del tracciato su cui il lavoro dovrà compiersi. Le fratture possono presentarsi come - complete - quando l'osso perde la sua unità e risulta scomposto in frammenti distinti, e incomplete - quando l'osso pur scongiurato con interessamento di un versante della compatta, mantiene la sua individualità per l'azione di contenimento della compatta opposta rimasta integra (incrinature, infrazioni, fessure). Possono essere semplici o complesse (con schegge), comminute (se vi sono numerose piccole schegge), chiuse ed esposte (Mensa 1942, Micheletto 1980, Cheli 1988). Concomitanti alle fratture possono rilevarsi artriti e artrosi traumatiche, distensioni-distrazioni articolari, rotture legamentose, tendinee, muscolari, sinoviti, ecc. (Cheli 1988).

### *MATERIALI E METODI:*

La nostra esperienza sul trattamento delle fratture delle ossa lunghe si riferisce a 23 cavalli, dei quali 16 trottatori, 6 da sella ed 1 pony, dell'età dai 2 giorni agli 11 anni, di cui 14 maschi e 9 femmine (Tab. I). Le fratture per

l'arto anteriore erano a carico di radio (9), ulna (1), metacarpo (2) e per l'arto posteriore di femore (1), tibia (5), metatarso (5). Quattro fratture erano esposte, 19 chiuse, 1 incompleta, 9 semplici, 13 complesse (Tab. II). Gli interventi sono stati effettuati in anestesia generale gassosa. In rapporto al tipo di frattura e alla mole del soggetto, sono state applicate tecniche di osteosintesi per fissazione interna, esterna, mista. La fissazione interna è stata impiegata in 9 casi, in 9 l'esterna e in 5 la mista (Tab. II).

Per la fissazione interna è stato impiegato materiale A.O. (Associazione per lo studio della Osteosintesi - Europa), A.S.I.F. (Associazione per lo Studio della Fissazione Interna - USA) consistente in viti da trazione corticali e da spongiosa, placche a compressione dinamica, placche da neutralizzazione; in taluni casi sono stati impiegati degli infibuli centromidollari con chiodi di Kuntscher. La fissazione esterna è stata realizzata con l'impiego di fissatori originali I.O.R. (Istituti Ortopedici Rizzoli) appositamente costruiti per cavalli e per puledri a configurazione fissa (Bignozzi 1982), un fissatore per uso umano di Stuhler-Heise a configurazioni variabili applicabile preferibilmente solo in puledri (Bignozzi 1985, Busetto 1984, Gnudi 1981), tutori "artigianali" costruiti con chiodi di Kirschner, ferule di lega leggera e bendaggi di fibra di vetro.

## *RISULTATI*

Dei 23 cavalli, 8 hanno presentato un decorso post-operatorio normale, in seguito al quale sono stati dichiarati clinicamente guariti. 15 hanno presentato delle complicanze costituite da avulsione o rottura di alcune viti, che non hanno interferito con il normale processo di cicatrizzazione, pur ritardandolo. In 2 casi di fratture complicate, fra quelle nelle quali era coinvolta anche l'articolazione, è comparsa anchilosi. In un caso si è manifestata osteomielite. In 6 casi la sintesi non ha offerto i requisiti necessari per una guarigione, tanto che si è constatata la non-unione, che ha imposto un nuovo intervento con l'adozione di un diverso sistema di fissazione. In 2 casi si è verificata recidiva, uno è stato immediatamente rioperato. In 1 caso il soggetto ha presentato complicanze renali probabilmente legate a riassorbimento di tossici, causa il coinvolgimento di vaste aree muscolari nel focolaio traumatico. Infine 1 soggetto, durante il normale decorso clinico, ha presentato un'infezione enterica salmonellare.

Quattro animali sono deceduti, 1 per salmonellosi, 1 per nefrosi, 2 sono stati soppressi a causa di "rifratture". Per gli altri la guarigione clinica è stata definita dalla compatibilità con la vita, seppure in presenza di deformità, alla ripresa della attività agonistica (Tab.II).

Tabella 1 - Segnalamento, trattamenti, complicanze ed esiti.

cavallo	età	sesso	segmento fratturato	I° intervento				complicanze	II° intervento				esito	
				v.t.	p.c.d.	p.n.	f.e.		v.t.	p.c.d.	p.n.	f.e.		
1)	trotto	2gg	f	radio	-	*	-	-	rottura placca	-	-	-	-	+++
2)	trotto	7gg	f	metacarpo	*	*	-	-	avulsione 3viti	-	-	-	-	+++
3)	sella	10g	f	radio	-	*	*	*	no callo via pl	-	-	-	*	+++
4)	trotto	12g	m	radio d.e.	*	-	-	-	-	-	-	-	-	++++
5)	sella	15g	m	metacarpo	-	*	-	-	avulsione 2viti	-	-	-	-	+++
6)	trotto	30g	m	tibia	-	-	-	*	no callo	-	-	-	*	+++
7)	trotto	32g	m	tibia	-	-	-	*	-	-	-	-	-	++++
8)	trotto	45g	f	tibia	*	-	-	*	-	-	-	-	-	++++
9)	sella	2m	m	ulna	-	*	-	-	-	-	-	-	-	++++
10)	trotto	3m	m	tibia d.e.	-	-	-	*	-	-	-	-	-	++++
11)	trotto	4m	m	metatarso	-	-	-	*	no callo	infibulo	centromidoll.	-	-	++++
12)	trotto	4m	m	radio	-	*	-	-	no callo	-	*	*	*	++++
13)	sella	5m	f	radio	-	*	*	-	-	-	-	-	-	++++
14)	trotto	5m	m	metatarso	-	-	-	*	no callo	infibulo	centromidoll.	-	-	++-
15)	sella	7m	m	radio	*	*	*	-	no callo	-	-	-	*	----
16)	trotto	2a	f	tibia	*	-	-	*	anchilosi t.t.	-	-	-	-	+++
17)	poney	2a	m	metatarso	-	*	-	-	osteomielite	-	-	-	-	+++
18)	trotto	3a	f	metatarso	*	-	-	*	-	-	-	-	-	+++
19)	trotto	3a	f	metatarso	*	-	-	*	-	-	-	-	-	++-
20)	trotto	5a	m	radio	-	-	-	*	anchilosi r.c.	-	-	-	-	+++
21)	trotto	7a	f	radio	-	-	-	*	nefrosi	-	-	-	-	----
22)	sella	9a	m	radio	-	-	-	*	rifrottura	-	-	-	-	----
23)	trotto	11a	m	femore	-	-	-	*	rifrottura	-	-	-	-	----

Legenda: v.t. = vite trazione / p.c.d. = placca compressione dinamica / p.n. = placca neutralizzazione / f.e. = fissatore esterno / +++ = in attività agonistica / ++ = in attività non agonistica / +- = femmina in riproduzione / + - - = deviazioni compatibili con la vita / - - - = decesso.

Tabella 2 - Localizzazione tipo di frattura, trattamenti ed esiti.

casi n°	segmento osseo	frattura esposta	frattura chiusa	frattura incompleta	frattura semplice	frattura complessa	fissazione			esiti posit	esiti negat
							interna	esterna	mista		
9	RADIO	1	8	-	6	3	5	3	1	6	3
1	ULNA	-	1	-	-	1	1	-	-	1	-
2	METACARPO	-	2	-	-	2	2	-	-	2	-
1	FEMORE	-	1	-	-	1	-	1	-	-	1
5	TIBIA	1	4	1	2	2	-	3	2	5	-
5	METATARSO	2	3	-	1	4	1	2	2	5	-
23		4	19	1	9	13	9	9	5	19	4

## *DISCUSSIONE:*

Il processo di cicatrizzazione dei tessuti duri nel cavallo è definito normale quando si realizza in un lasso di tempo che si aggira mediamente attorno ai 90 giorni (Micheletto 1980, Turner 1990, Fackelman 1982, Denny 1993). E' universalmente acquisito che ciò sia in dipendenza dell'età e della mole del soggetto, delle tecniche di fissazione impiegate e delle situazioni ambientali pre- e post-operatorie in cui il paziente si trova. In realtà la cicatrizzazione per prima intenzione nella ossa lunghe del cavallo è difficile ad attuarsi, mentre quella per seconda o per callo, in cui si verifica una ossificazione di tipo encondrale, è possibile. E' noto che la cicatrizzazione per prima si realizzi più rapidamente rispetto a quella per callo, ma per quanto riguarda le ossa lunghe, la prima è molto rara a verificarsi in questa specie.

Analogo risultato si è registrato durante la nostra esperienza: in pochissimi casi la cicatrizzazione è avvenuta per prima, in diversi in maniera mista, in un'alta percentuale per seconda. Questi dati non si discostano molto da quelli di altri ricercatori (Clayton-Jones 1975, Denny 1978).

E' ovvio che l'intento del chirurgo sia quello di operare al fine di una cicatrizzazione di tipo angiogeno e se ciò non avviene è da imputare, a nostro avviso, alla costituzione anatomica dell'arto del cavallo nel suo insieme piuttosto che all'organo-osso. Quest'ultimo assume un ruolo maggiore nella patogenesi della malattia chirurgica, minore nel processo di guarigione. Mentre è l'arto che nel suo complesso condiziona negativamente il processo di cicatrizzazione, perché concorre in maniera attiva nelle funzioni di sostegno, ammortamento e moto, tramite le inclinazioni angolari dei vari segmenti ossei in corrispondenza delle articolazioni e il gioco agonista - antagonista esercitato dalle possenti strutture muscolari, tendinee, legamentose sui vari punti chiave inserzionali e in virtù delle forze esercitate mediante leve e carrucole dalle masse muscolari (Alexander 1973). L'arto va quindi inteso come un sistema fisico complesso, la cui solidità va ascritta all'insieme globale delle forze che vengono esercitate su di una intelaiatura ossea relativamente fragile: il tutto paragonabile ad un albero di una imbarcazione a vela che resiste alle sollecitazioni del vento ed alle resistenze dello scafo con le sartie, gli stralli e le drizze e che, al cedere di solo uno di questi, disalbera.

Sotto questa luce è comprensibile come l'osso ricostituito da un qualsiasi mezzo di fissazione non sia in grado di sopportare sufficientemente, immediatamente dopo l'intervento chirurgico, il carico cui viene sottoposto (non si dimentichi che il cavallo mantiene pressochè costantemente la stazione

durante la sua vita). Viene anche alterato dal trauma o dall'intervento chirurgico il sistema di forze agoniste-antagoniste esercitato sul segmento considerato, realizzandosi talvolta rotture e scontinuaioni di taluni muscoli ed inserzioni desmo-tendinee.

Tale "precarietà" di equilibrio di forze dovrebbe essere supportata, durante la guarigione, per la maggior parte dalla compattezza dell'osso cui viene ancorata la protesi e quindi, nel complesso, dalla solidità della sintesi.

Queste, a nostro avviso, sono le ragioni che portano ai risultati registrati.

E' il problema tecnico, non ancora risolto, di offrire sufficiente supporto temporaneo alle sollecitazioni sul segmento sottoposto a sintesi nell'immediato post-operatorio, che non riesce sempre a favorire la cicatrizzazione per prima. Ciò è avvalorato da una parte dalle "rifratture", che si ripresentano al momento del risveglio dalla anestesia ed alla ripresa della stazione quadrupedale e, dall'altro, dall'elevato numero di successi registrato nei soggetti molto giovani, la cui mole esigua influisce scarsamente sul decorso post-operatorio e l'altissima percentuale (vicina al 100%) di insuccessi nei soggetti adulti (Tab.II).

Le intense sollecitazioni provocano nell'osso sofferenza tissutale (alisteresi) nei punti di inserzione delle viti e/o delle protesi esterne molto precocemente a verifica della sufficiente solidità delle stesse protesi impiegate. Questo fatto causa precoce mobilità, più o meno intensa, della sintesi con coseguente guarigione per seconda.

## CONCLUSIONI

Le tecniche chirurgiche anestesiolgiche e ortopediche hanno permesso l'approccio del veterinario alle fratture delle ossa del cavallo (Masetti 1994). Mentre interventi di ortopedia sulle ossa corte (falangi) offrono alte percentuali di guarigione ottimale anche nel cavallo adulto, quelli sulle ossa lunghe sembrano ancor'oggi affrontabili positivamente limitatamente ai puledri.

Le tecniche di fissazione interna, tramite viti di trazione, placche a compressione dinamica e di neutralizzazione e di fissazione esterna, sono preferite rispetto alle tecniche di fissazione interna tramite protesi centromidollare. Quest'ultima tecnica infatti presenta due svantaggi rappresentati dalla necessità di ulteriori dissezioni chirurgiche che permettano l'accesso delle protesi attraverso vie obbligate, non sempre agevoli nel grosso animale e che le protesi centromidollari disponibili non permettono mai una fissazione stabile.

Nessuno dei vari supporti materiali a latere o l'immissione del paziente, durante il recupero, anche in piscine, suggeriti dai vari Autori, si è dimostra-

to sufficientemente utile ad ovviare agli inconvenienti prodotti dal carico massivo e repentino fino dai primi momenti dopo l'intervento. Talvolta questo carico è apparso più intenso proprio sul segmento osseo su cui si è operata la sintesi, quasi che il cavallo voglia provare immediatamente l'efficacia dell'operato del chirurgo.

Sotto quest'ultimo aspetto non si vede ancora come risolvere il problema costituito dalla necessità di non sollecitare il segmento trattato immediatamente dopo l'intervento chirurgico, o per lo meno in maniera meno intensa e più graduale. Nell'uomo questo periodo è superato dalla non sollecitazione volontaria della regione; nel cavallo ciò non è possibile ! Fino a che non sarà trovata una soluzione valida a questo problema, è nostra opinione che le fratture delle ossa lunghe del cavallo adulto presenteranno sempre una bassa percentuale di esiti positivi.

L'esposizione della relazione è seguita dall'illustrazione dei casi clinici tramite diapositive.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Alexander J.T., Rooney R.J., 1973, *The biomechanics, surgery and prognosis of equine fractures*, Proc . XVIIIth Ann. A.A.E.P., 219-225;
- 2) Auer J.A., 1992, *Equine surgery*, Saunders Philadelphia;
- 3) Barone R., 1974, *Anatomia comparata dei mammiferi domestici*, Edagricole Bologna, I;
- 4) Bignozzi L., Venturini A. et al., 1978, *Contributo alla osteosintesi delle ossa lunghe del cavallo*, Atti S.I.S.Vet., XXXII,318;
- 5) Bignozzi L., Busetto R. et al., 1979, *Osteosintesi a compressione interframmentaria in frattura diafisaria completa e scheggiata del terzo metatarso sinistro in cavalla da corsa al trotto*, Atti S.I.S. Vet ., XXXIII, 189;
- 6) Bignozzi L., Gnudi M. et al., 1980, *Contribution to surgical treatment of equine long bone fractures*, Atti XIII Congr. E.S.V.S., Budapest, 127-131;
- 7) Bignozzi L., Muttini A. et al ., 1981, *Trattamento chirurgico di fratture del radio in cavalli adulti*, Atti S.I.S.Vet., XXXV, 464-465;
- 8) Bignozzi L., Gnudi M. et al ., 1981, *Half pin fixation in 2 cases of equine long bone fracture*, Equine Vet. J., 13, 1, 64-66;
- 9) Bignozzi L., Gnudi M. et al., 1982, *Contributo al trattamento chirurgico delle fratture complete dello stinco in puledri*, Atti S.I.S.Vet., XXXVI, 261-264;
- 10) Bignozzi L., Gnudi M. et al ., 1982, *External fixation and internal osteosynthesis in horses: results in clinical cases of long bone fractures*, Atti XIV Congr. E . S.V.S., Istanbul, 77-81;
- 11) Bignozzi L., Busetto R. et al., 1985, *Trattamento di distacchi epifisari del puledro con particolari montaggi del fissatore esterno di Stuhler-Heise*, Atti S.I.S.Vet. XXXIX, 2, 201-

- 12) Bignozzi L., Busetto R. et al., 1990, *Experiences in the treatment of radial and cannon bone fractures in foals with boneplates*, Atti XVIII Congr. E.S.V.S., Uppsala, 17-19;
- 13) Bignozzi L., Busetto R. et al., 1990, *Osteosintesi con placche a compressione dinamica di frattura del radio in una puledra*, Atti S.I.S.Vet. XLIV, 1841-1844;
- 14) Brooker A. F., Edwards C.C., 1979, *External fixation, the current state of the art*, Williams e Wilkins Co., Baltimore;
- 15) Busetto R., Muttini A. et al., 1984, *Primo impiego del fissatore esterno di Stuhler-Heise nel cavallo adulto: trattamento di una frattura scheggiata della tibia*, Atti S.I.S.Vet., XXXVIII, 275-277;
- 16) Clayton-Jones D.J., 1975, *The repair of equine fractures 1843-1975*, Vet. Rec., 97, 193-197;
- 17) Cheli R., 1988, *Clinica Chirurgica Veterinaria*, UTET, Torino;
- 18) Denny H.R., 1978, *The surgical treatment of equine fractures*, Vet. Rec., 102, 273-277;
- 19) Denny H.R., 1993, *Trattamento delle fratture equine*, Edagricole Bologna;
- 20) Fackelman G.E., Nunamaker D.M., 1982, *Manual of internal fixation in the horse*, Springer-Verlag, Berlin- Heidelberg- New York;
- 21) Gnudi M., Muttini A. et al., 1981, *Prime note sull'impiego del fissatore esterno di Stuhler-Heise nella traumatologia del puledro*, Atti S.I.S.Vet., XXXV, 466-467;
- 22) Gnudi M., Busetto R. et al., 1984, *Trattamento di fratture olecraniche in puledro con placca a compressione dinamica*, Atti S.I.S.Vet., XXXVIII, 277-279;
- 23) Masetti L., Trucchi G., 1994, *L'anestesia generale nel cavallo traumatizzato*, Atti S.I.C.V., I, 27-46;
- 24) Mensa A., 1942, *Patologia Chirurgica veterinaria*, UTET, Torino;
- 25) Micheletto B., 1980, *Patologia Chirurgica Veterinaria e Podologia*, UTET, Torino;
- 26) Pigato M., Spadari A. et al., 1994, *Cortical screw osteosynthesis in two cases of Salter-Harris type II lesions in foals*, Atti II Int. Coll. on Working Equines, Rabat, 34-36;
- 27) Spadari A., Joehler M., 1993, *Osteosintesi a compressione interframmentaria in frattura di Salter-Harris del 2° tipo del 3° metatarso in un puledro trotatore*, XI Congr. Naz. S.I.D.I., 221-227;
- 28) Spadari A., Busetto R. et al., 1994, *Fissazione secondaria, integrativa o sostitutiva, dopo osteosintesi "AO" in fratture di ossa lunghe del puledro*, Atti S.I.S.Vet. XLVIII, in stampa;
- 29) Stashak T.S., 1990, Adams' *La zoppicatura nei cavalli*, Sbm, Noceto-Parma.

# L'ALIMENTAZIONE DEL CAVALLO ATLETA

GATTA D.

*Dipartimento di Produzioni Animali - Pisa*

## INTRODUZIONE

Il cavallo atleta è soggetto a notevole impegno fisico e stress: carichi di lavoro molto intensi, lavoro ripetitivo, attività agonistica frequente e situazioni ambientali sfavorevoli.

Tutte queste condizioni possono portare ad una diminuzione dello stato di benessere dell'animale con riduzione delle prestazioni atletiche o, in casi più gravi, a forme patologiche più o meno importanti con ripercussioni sulla carriera sportiva.

Alcune di queste patologie possono essere attribuite del tutto od in parte ad un errato management alimentare. Infatti tra i vari fattori esogenetici l'alimentazione ha assunto un ruolo fondamentale nel miglioramento della condizione psico-fisica del soggetto e quindi della prestazione; una corretta gestione alimentare, basata su un individuale ed equilibrato apporto quantitativo dei principi nutritivi è indispensabile per permettere al cavallo atleta l'esplicarsi delle proprie potenzialità genetiche.

Purtroppo il razionamento del cavallo atleta è ancora in molti casi approssimativo e affidato alla tradizione piuttosto che a criteri scientifici ed è facile riscontrare in molte scuderie, anche di ottimo livello, piani alimentari non pienamente rispondente ai fabbisogni degli animali (Gatta et al. 1994, a; Gatta et al. 1994, b).

La dieta, infatti, deve essere adeguata al tipo di attività fisica richiesta al cavallo che può variare da sforzi brevi ma intensi (corse al galoppo, al trotto) a sforzi lunghi ma di moderata intensità (endurance), tenendo conto che la base delle diverse performances equine è comunque la conversione dell'energia chimica degli alimenti in energia meccanica per il movimento muscolare.

## *BASI FISIOLOGICHE DEL LAVORO MUSCOLARE ED UTILIZZAZIONE DEL SUBSTRATO*

L'energia deve essere immagazzinata nell'organismo e rilasciata al momento della richiesta. Esistono diverse forme di deposito delle varie fonti

energetiche che il cavallo può utilizzare: glicogeno muscolare, glicogeno epatico, trigliceridi e tessuto adiposo.

L'adenosinatrifosfato (ATP) è il diretto fornitore di energia per la contrazione muscolare. Essendo questa sostanza poco rappresentata quantitativamente nel muscolo rispetto alle necessità, essa deve essere continuamente rigenerata. E' un'altra molecola, la fosfocreatina, che provvede velocemente al ripristino di ATP a partire da adenosinadifosfato (ADP) ed è grazie al catalizzatore creatina-fosfochinasi che controlla la produzione di ATP + creatina.

La notevole e pronta energia formata da questa reazione garantisce tra l'altro il mantenimento delle riserve di ATP necessarie alla vita delle cellule del tessuto muscolare.

Un'ulteriore reazione che porta a formazione di ATP è quella catalizzata dall'enzima miochinasi ( $2 \text{ ADP} \rightarrow \text{ATP} + \text{AMP}$ ). Quest'ultima è però una reazione reversibile e con equilibrio assoluto per cui spontaneamente non si hanno modificazioni nei rapporti quantitativi tra ATP e ADP.

Dopo 3 o 4 secondi dall'inizio di un esercizio per il quale non vi è adeguata disponibilità di ossigeno, la rifosforilazione di ADP in ATP non è più sostenuta dalla fosfocreatina ma dalla glicolisi anaerobica. Tale processo utilizza le riserve di glicogeno, soprattutto di origine muscolare, e porta a produzione di acido lattico, il quale si trova fisiologicamente come ione lattato e ione  $\text{H}^+$ .

La glicolisi si svolge prettamente in alcune fibre muscolari (tipo II) particolarmente ricche di enzimi glicolitici e di glicogeno.

E' importante ricordare che una notevole parte del lattato formato in questo processo viene direttamente ossidato nel muscolo, in particolare ad opera di certe fibre molto ricche di mitocondri ed enzimi ossidativi, ad alto contenuto in mioglobina e con rete capillare molto estesa. I limiti delle fonti anaerobiche di ATP (essenzialmente la glicolisi che conferisce un guadagno netto di 2 ATP per molecola di glucosio) sono dati dalla deplezione delle scorte di glicogeno ed ancor più, soprattutto negli sforzi intensi, dall'accumulo di cataboliti non eliminabili (Mc Miken, 1983).

L'altra grande fonte di ATP per il muscolo è la fosforilazione aerobica. Questo processo sfrutta l'energia derivante dall'ossidazione dei glucidi e dei lipidi.

Il glucosio utilizzato nell'esercizio aerobico proviene soprattutto dal sangue, dal fegato o direttamente dall'assorbimento intestinale. Il fegato è la principale fonte di zuccheri in esercizi di lunga durata. Una quota di energia,

peraltro come vedremo molto variabile, è formata dalla ossidazione dei lipidi, mobilizzati ad acidi grassi.

La fosforilazione ossidativa, che porta al guadagno netto di 36 ATP, trova nella necessità del continuo apporto di ossigeno e nella lentezza di questo processo i suoi limiti, che si traducono essenzialmente nella impossibilità di fornire una prestazione massimale, ossia uno sforzo molto intenso e rapido (oltre il 70%).

Il vantaggio dell'utilizzo di questa via metabolica da parte del muscolo sta nella possibilità di usufruire, quale fonte energetica, delle riserve praticamente illimitate di trigliceridi dell'organismo.

Il metabolismo energetico muscolare privilegia ampiamente la glicosi anaerobica rispetto al processo aerobico, e ciò è da ricondurre alle proporzioni assunte dai diversi tipi di fibre muscolari alle quali abbiamo in precedenza accennato e che compongono i muscoli scheletrici.

Le percentuali delle diverse fibre sono geneticamente determinate e poco modificabili con l'adattamento fisiologico (Wolter, 1991) (figura 1). Il puro sangue inglese, come il quarter horse, noto sprinter, oltre ad avere un numero superiore di fibre rispetto agli altri cavalli nei muscoli locomotori, presenta una elevata percentuale di fibre veloci (tipo II). Le fibre muscolari veloci di tipo II si possono suddividere a loro volta in IIB, aventi proprietà quasi esclusivamente glicolitiche, e IIA le quali presentano anche strutture adatte a produrre energia dall'ossidazione (tabella 1).

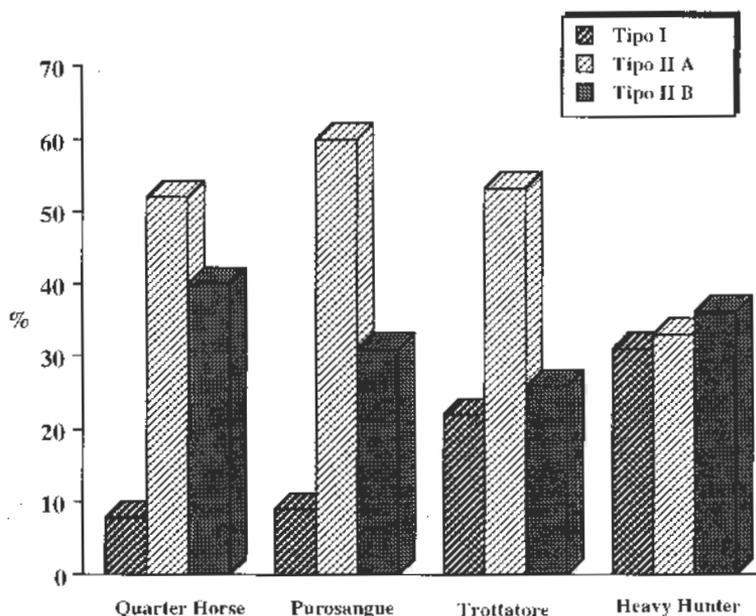
In proposito è stato determinato che una certa percentuale di fibre IIB possono con l'allenamento diventare simili alle IIA, cioè con capacità ossidative superiori (Essen- Gustavsson et al., 1980; Henckel, 1983). Tuttavia, mentre una fibra veloce può acquisire una maggiore durata di contrazione riducendo la sua velocità, una fibra lenta di tipo I non può in alcun modo acquistare una maggior velocità di contrazione (Mc Miken, 1983). Con l'allenamento è quindi possibile incrementare soprattutto le capacità metaboliche aerobiche ottimizzando l'utilizzo delle riserve di glicogeno muscolare e riducendo l'accumulo di cataboliti (Cutmore et al., 1986).

Grazie a questi adattamenti il muscolo utilizza una percentuale superiore di lipidi risparmiando più efficientemente il glicogeno con una conseguente riduzione della produzione di acido lattico.

## *ENERGIA DELLA DIETA*

L'energia della dieta è espressa usualmente in Kilocalorie (Kcal) o Megacalorie (Mcal) di energia digeribile (ED).

Figura 1: Tipi di fibre muscolari in differenti razze



(da Pagan, 1992)

Tabella 1 - Caratteristiche metaboliche dei differenti tipi di fibre muscolari.

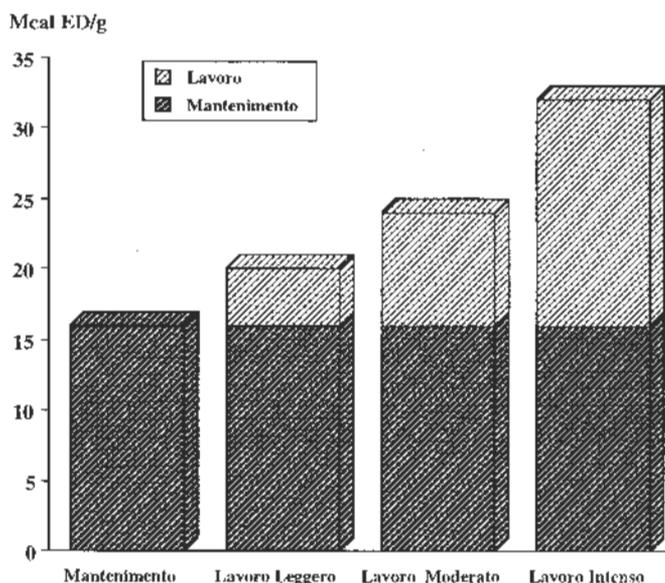
CLASSIFICAZIONE	Tipo I	Tipo II	
	contrazione lenta	contrazione rapida altamente ossidativa (II A)	contrazione rapida (II B)
velocità di contrazione	lenta	veloce	veloce
massima tensione sviluppata	bassa	alta	alta
capacità ossidativa	alta	da intermedia a alta	bassa
densità capillare	alta	intermedia	bassa
contenuto in lipidi	alto	intermedio	bassa
contenuto in glicogeno	intermedio	alto	alto
resistenza alla fatica	bassa	intermedia	alta

(da Pagan, 1992)

L'ED si riferisce alla quantità di energia della dieta che viene assorbita dall'animale.

I fabbisogni in ED sono calcolati sulla base dei fabbisogni di mantenimento ai quali viene aggiunta la quantità di energia addizionale che viene spesa durante l'attività fisica (figura 2).

Figura 2 - Fabbisogni in Energia Digeribile per il lavoro (NRC 1989) (per un cavallo di 500 Kg p.v.)



(da Pagan, 1992)

## *FONTI ENERGETICHE*

Le principali fonti energetiche sono carboidrati (amido e fibra), lipidi e proteine. La misura in cui ciascuna di queste fonti viene utilizzata per la contrazione muscolare varia in dipendenza da diversi fattori, alcuni dei quali già abbiamo citato, inclusi l'intensità e la durata dell'esercizio, la disponibilità di carboidrati o di fonti alternative e l'influenza degli ormoni.

## *CARBOIDRATI*

A riposo il metabolismo muscolare è essenzialmente sostenuto dai lipidi,

con un consumo di ossigeno inferiore alla metà di quello necessario per l'ossidazione dei carboidrati.

Aumentando l'intensità dell'esercizio, la quota di energia fornita dai carboidrati aumenta progressivamente finché ad intensità massimale, come in uno sprint, tutto l'ossigeno consumato dai muscoli serve per l'ossidazione dei carboidrati (Saltin e Gollnick, 1988) i quali inoltre, per far fronte alle esigenze di tale prestazione, seguono la via anaerobica determinando anche l'aumento dell'acido lattico.

I carboidrati utilizzati dal muscolo sembrano pervenire in massima parte dal glicogeno muscolare. Il ruolo del glucosio ematico sarebbe inferiore e varierebbe secondo alcune esperienze, peraltro tuttora controverse, da un minimo del 10% a riposo fino al 75% circa in un esercizio submassimale prolungato, in misura inversamente proporzionale all'esaurirsi progressivo delle riserve di glicogeno muscolare (Felig e Wahren, 1977). I livelli di glucosio ematico sono mantenuti dalle riserve glicogeniche epatiche oltre che da quelle provenienti dalla dieta.

Il rilascio del glucosio a livello epatico avviene grazie alla glicogenolisi, mentre la sua importanza va aumentando col prolungarsi della prestazione (fino al 45% circa del glucosio epatico). La neoglucogenesi si ha a partire da precursori come lattato, glicerolo e aminoacidi (alanina).

La regolazione del processo deriva da mutamenti ormonali e dalla disponibilità dei substrati (Winder, 1985).

### *I CARBOIDRATI NELLA DIETA (AMIDO)*

Costituiscono anche per il cavallo atleta la componente preponderante dell'apporto energetico. L'amido rappresenta il 50-70% della sostanza secca della cariossida dei cereali (maggior contenuto nel mais, poi orzo e avena).

Ci sono però dei limiti di ordine digestivo e metabolico relativamente all'apporto glucidico della dieta. L'amido viene digerito in gran parte nell'intestino tenue, trasformandosi in glucosio dal rendimento energetico ottimale. Nel cavallo però l'attività amilasica è limitata (Roberts, 1974): un apporto troppo abbondante o comunque brusco può inibire la digestione enzimatica nel tenue e determinare un substrato troppo fermentescibile per la microflora dell'intestino crasso. Le conseguenze negative possono andare da semplice acidosi digestiva a forte accumulo di endotossine con ripercussioni anche gravi (coliche, podoflemmatiti).

E' pertanto utile limitare la dose giornaliera di cereali ed aumentare il numero di somministrazioni giornaliere. Diversi sono pure i trattamenti

auspicabili per elevare la digeribilità dei cereali quali la schiacciatura e la bagnatura. Anche la cottura dei cereali facilita la digestione riducendo la produzione di calore e diminuendo le fermentazioni microbiche.

Riferendosi all'aspetto metabolico, gli estrattivi inazotati possono accrescere la riserva glicogenica muscolare.

Attualmente siamo però a conoscenza delle possibili complicanze di questa pratica; essa può infatti determinare un eccessivo catabolismo anaerobico per la facile e cospicua disponibilità di glicogeno, provocando così accumulo di acido lattico e fenomeni patologici muscolari (rabdomiolisi acute) soprattutto alla ripresa di un lavoro impegnativo seguente ad una fase di riposo.

Inoltre i benefici di un "carico di glicogeno" sono a tutt'oggi poco chiari, soprattutto nel cavallo. Infatti in sforzi brevi ed intensi, quali le gare dei purosangue tra i 1000 e i 2000 metri, la deplezione del glicogeno muscolare è inferiore al 50%, e la disponibilità dello stesso a fine corsa è ancora notevole: la riduzione del substrato non costituisce pertanto un limite alla prestazione (Nimmo e Snow, 1983; Harris et al., 1987).

Diversa può essere l'utilità di una scorta di glicogeno per un soggetto sottoposto ad uno sforzo prolungato nel tempo.

In questo caso l'affaticamento è dovuto all'incapacità da parte del fegato a rilasciare glicogeno tenendo il passo con la sua assunzione a livello muscolare (Lawrence, 1990). Pertanto l'uso di glucosio per via orale può ritardare lo stato di fatica mantenendo costante il suo livello nel sangue. A proposito dell'integrazione glucidica va però ricordato che il glucosio ingerito da 30' a 90' prima dell'esercizio determina, per il rapido assorbimento, una iperinsulinemia la quale favorisce l'assimilazione del glucosio, la sintesi del glicogeno, la lipogenesi ed inibisce la lipolisi (Costill et al., 1977; Maughan e Gleeson, 1988). Durante il seguente esercizio avremo pertanto un utilizzo superiore del glucosio ematico ed una ridotta utilizzazione dei lipidi per minore disponibilità di acidi grassi liberi. Il risultato, in uno sforzo submassimale di resistenza, sarà la riduzione della prestazione.

Più indicato semmai l'utilizzo di altri zuccheri ad assorbimento progressivo e meno iperinsulinemici quali fruttosio e sorbitolo, i quali permettono un maggior utilizzo dei grassi (Massicotte et al., 1986).

## *LIPIDI*

Sono la maggiore riserva energetica dell'organismo, di 30-60 volte superiore a quella dei carboidrati (Gollnick e Saltin, 1988).

Le fonti lipidiche disponibili per il muscolo sono essenzialmente tre. La più importante è costituita dagli acidi grassi liberi. Essi derivano dal tessuto adiposo, sono veicolati nel sangue tramite le albumine e captati dal muscolo per l'ossidazione.

La lipolisi, all'origine della disponibilità degli acidi grassi, è inibita dall'insulina, mentre è favorita dalle catecolamine, dal glucagone e dal cortisolo.

E' documentato l'aumento degli acidi grassi liberi (NEFA) nel plasma durante l'esercizio di lunga durata (Paul et Issekurtz, 1967). E' stato evidenziato che una concentrazione elevata di NEFA prima dell'esercizio submassimale determina:

- minore consumo di O<sub>2</sub>;
- minore produzione di acido lattico;
- minore utilizzazione di glicogeno, rispetto ad una dieta a contenuto normale di NEFA (Costill et al., 1977). In esercizi ad alta intensità questi effetti sono invece limitati.

Snow et al. (1983) ritengono inoltre che, grazie alla sua grande capacità aerobica, il cavallo possa avere una particolare abilità nell'utilizzare i lipidi anche durante lavori ad elevata intensità.

Le altre fonti lipidiche sono costituite dalla riserva di trigliceridi intramuscolari e dai trigliceridi circolanti. La loro rispettiva importanza è tuttora motivo di studio. Secondo alcuni autori sarebbero una fonte energetica importante per le fibre a lenta contrazione (Mackie et al., 1980).

## *I LIPIDI NELLA DIETA*

Possedendo una forte concentrazione energetica (2,25 volte in più dei protidi e degli estrattivi inazotati), i lipidi si prestano ad essere aggiunti alla dieta per incrementarne il contenuto in energia senza aumentare di molto la somministrazione di alimento. Hanno una digeribilità molto elevata (> del 90% per gli olii vegetali) e, al contrario dell'amido, non hanno effetti negativi sulla microflora intestinale.

Molti metodi sono stati suggeriti e sperimentati considerando di volta in volta la percentuale di grassi sul totale della dieta (Hambleton et al., 1980; Hintz et al., 1977) o il corrispondente contenuto calorico sul totale (20-40%) (Duren et al., 1987).

Anche a causa dei parametri utilizzati, spesso differenti, è arduo estrapolare conclusioni definitive. Tuttavia la quantità di grassi in mangimi per cavalli da corsa dovrebbe mantenersi tra il 6 e il 10% (Pagan e Jackson, 1992).

Sembra comunque che una incrementata assunzione di grassi determini adattamenti metabolici che permettono ai cavalli di utilizzare preferibilmente questa fonte risparmiando glicogeno durante l'esercizio, soprattutto in sforzi submassimali di resistenza (Meyers et al., 1987; Oldham et al., 1989). Anche la stabilità della glicemia risulterebbe aumentata.

I grassi insaturi sono più predisposti ad essere ossidati, mentre i saturi sono più facilmente depositati. Vantaggioso risulta l'uso di acidi grassi a catena media, più facilmente digeriti anche in caso di insufficienza biliare, più agevolmente trasportati nell'organismo e metabolizzati senza bisogno di carnitina (indispensabile per quelli a catena lunga) (Wolter, 1991).

Anche l'utilizzo di acidi grassi essenziali è auspicabile. Essi entrano nella costituzione delle membrane biologiche; la loro poliinsaturazione aumenta la permeabilità della membrana e, con questa, l'intensità del metabolismo energetico. Risulta opportuno, nel caso di integrazione lipidica, un riequilibrio dell'aumentata concentrazione energetica basato sulla fornitura di vitamine antiossidanti coinvolte nel metabolismo degli acidi grassi.

Anche la somministrazione di veicoli essenziali, come appunto la carnitina, costituisce un'ulteriore garanzia dei benefici effetti sul metabolismo energetico ad opera dei grassi di integrazione. E' necessario inoltre, in caso di diete ad alto contenuto lipidico, aumentare gli apporti di magnesio per bilanciarne le perdite fecali sottoforma di saponi (Wolter, 1991).

## *PROTEINE*

Se vengono somministrate quantità di proteine superiori ai fabbisogni, l'eccesso viene utilizzato come fonte energetica.

Gli aminoacidi sono disponibili per la trasformazione a mediatori del ciclo dell'acido citrico, o per la sintesi del glucosio o ancora per l'ossidazione. Infatti diversi aminoacidi possono essere convertiti ad intermedi del ciclo dell'acido citrico, ottenendo così un risparmio delle scorte di glicogeno. Similmente lo scheletro carbonioso di alcuni aminoacidi può venire utilizzato per la formazione di piruvato, disponibile per l'ossidazione o per la produzione di glucosio.

Quantificare il contributo alla produzione di energia nel muscolo da parte degli aminoacidi è difficile. Per essere ossidato lo scheletro aminoacidico deve essere privato del gruppo aminico, per deaminazione o transaminazione. Queste reazioni avvengono essenzialmente a livello epatico, eccetto per gli aminoacidi a catena ramificata che vengono metabolizzati a livello muscolare.

Esiste anche un ciclo alanina-glucosio, a testimoniare la connessione tra il metabolismo aminoacidico e quello glucidico. Infatti durante un lavoro intenso il muscolo rilascia alanina il cui livello plasmatico aumenta. Quest'ultima agisce come un importante precursore del glucosio nel fegato e contribuisce pertanto a mantenere il livello di glucosio ematico durante l'esercizio. Il ciclo alanina-glucosio si chiude giacché la maggior parte del piruvato utilizzato per formare alanina deriva dal glucosio ematico e dal glicogeno muscolare (Felig e Wahren, 1977). Inoltre alanina e glutammina rivestono il ruolo fondamentale di trasportatori di azoto aminico dal muscolo al fegato; essi sono stati osservati aumentare durante l'esercizio (Miller e Lawrence, 1986). Al fegato il gruppo aminico è ceduto al glutammato, poi catabolizzato ad urea. Durante l'esercizio quindi dall'ossidazione degli aminoacidi deriva il gruppo aminico che viene captato per essere poi escreto in urea. Questo processo fa sì che la combustione delle proteine non sia ottimale nella produzione di energia poiché la sintesi e l'escrezione dell'urea richiedono energia.

Altro aspetto del catabolismo azotato è la produzione di ammoniaca, che aumenta nel plasma in seguito ad esercizio intenso. Questa, per la sua neurotossicità e capacità di alterazione del metabolismo ossidativo, provoca affaticamento e calo delle prestazioni (Essen-Gustavsson e Valberg, 1980; Miller e Lawrence, 1986; Miller e Lawrence, 1989). Inoltre, stimolando la glicolisi anaerobica, utile ma solo a breve termine, determina l'accumulo di acido lattico (Cutmore et al., 1986).

## *LE PROTEINE NELLA DIETA*

Gli eccessi proteici, per quanto frequenti a verificarsi, sono da evitare. Il rischio a livello digestivo è innanzitutto quello di determinare dei dismicrobismi con fenomeni putrescenti nel grosso intestino per eccessiva formazione di cataboliti azotati. Se questi fenomeni sono più rari a verificarsi, esistono invece delle complicanze a livello metabolico che sconsigliano l'uso delle proteine come fonte energetica.

I residui azotati derivanti dal loro catabolismo sovraccaricano infatti il fegato ed il rene deputati alla detossificazione dell'organismo ed esercitano inoltre un effetto inibitorio sul ciclo di Krebs privandolo di alcuni intermedi che si rendono necessari al loro smaltimento.

Il sovraccarico azotato aumenta l'ammoniemia, la sudorazione e la diuresi incrementando pertanto il fabbisogno idrico (Slade et al., 1975). In proposito è da sottolineare che il cavallo possiede grandi capacità di sudorazione e, in

sforzi prolungati, la perdita idrica può essere notevole (fino all'8% del peso vivo in 5 h); questo predispone ad una rapida disidratazione ed al calo dei tassi ematici di diversi ioni (Cl, Na, K, Cu, Mg) mentre aumenta la fosfatemia (Snow, 1984). Inoltre una maggiore escrezione di ammoniaca nelle urine può portare ad un aumento della sua concentrazione nell'aria dei ricoveri ed a conseguenti problemi respiratori.

E' indubbio che l'esercizio aumenti i fabbisogni proteici ed aminoacidici oltre i livelli di mantenimento, sia per le perdite azotate (sudore) sia per la maggiore ritenzione nel processo di ipertrofia muscolare, importante soprattutto nelle prime fasi della preparazione fisica e nei soggetti giovani (Meyer, 1987).

Inoltre lo stress legato all'attività fisica intensa determina maggiore secrezione di cortisolo favorendo il catabolismo proteico e con esso il possibile instaurarsi di un'anemia per diminuita eritropoiesi (Weiss et al., 1983). Quest'ultima evenienza è tuttavia collegata a carenze aminoacidiche e proteiche, le quali non sono solite verificarsi nell'alimentazione del cavallo sportivo.

Sostanzialmente una integrazione proteica al fine di fornire un supplemento energetico è decisamente sconsigliabile, sia da un punto di vista metabolico che puramente economico.

La percentuale ottimale di proteina grezza in una razione per cavalli in attività dovrebbe quindi essere del 12% (NRC, 1989).

## *FIBRA GREZZA*

La fibra grezza è la sostanza tipica dei tessuti vegetali, nei quali adempie alla funzione di sostegno e di protezione delle cellule.

E' composta chimicamente da un insieme di composti glucidici indigeribili per via enzimatica: cellulosa, emicellulosa, pectina, lignina.

Nel cavallo, erbivoro monogastrico, la fibra subisce una digestione microbica molto evidente nel grosso intestino e secondo Wolter (1993) avrebbe 3 ruoli ben distinti:

1) prolungamento della masticazione (dovuto alla presenza nella razione di foraggi lunghi) con i seguenti vantaggi:

- tranquillizzazione psicologica dell'animale;
- stimolazione della secrezione salivare;
- regolazione riflessa della motricità gastrointestinale;

2) azione di ingombro (per la frazione indigeribile), che è indispensabile al mantenimento del transito intestinale: si assicura così una prevenzione di

stasi, dismicrobismi ed autointossicazioni da cui possono derivare diarree, coliche, laminiti, miositi, ecc.

3) apporto energetico (dovuto alla produzione di acidi grassi volatili dalla frazione fermentescibile) più economico ma con un rendimento metabolico e digestivo minore delle fonti amilacee.

Secondo Wolter (1993) quindi, la razione totale dovrebbe contenere un minimo del 17% di fibra grezza e/o 20% di NDF e/o 12-13% di ADF in modo da assicurare una durata della masticazione di almeno 4 - 5 ore al giorno.

Una fonte fibrosa molto interessante per il cavallo sportivo sono risultate le polpe essiccate di barbabietola: infatti hanno un contenuto proteico relativamente basso (8-10%), un valore energetico simile a quello dell'avena ed una elevata quantità di pectine che possono essere digerite nel grosso intestino, rilasciando energia lentamente e per un periodo di tempo più lungo.

### *MINERALI E VITAMINE*

Trattando di alimentazione del cavallo atleta, anche se è stato privilegiato l'aspetto energetico, non bisogna dimenticare l'importanza di un corretto apporto di minerali e vitamine, indispensabili al raggiungimento delle migliori performances sportive.

I minerali, infatti, prendono parte a numerosi processi fisiologici come costituenti delle più diverse sostanze organiche ed inorganiche del corpo.

Le quantità disponibili per il cavallo dipendono largamente dal tipo di alimento assunto e dalle caratteristiche specifiche di quest'ultimo, in particolare se si tratta di foraggio, concernenti sia lo stadio di sviluppo che le condizioni di sfalcio.

Nel cavallo la deplezione minerale è inoltre particolarmente accentuata dalla abbondante sudorazione iperionica, proporzionale alla intensità ed alla durata dello sforzo oltre che variabile e con le condizioni climatiche e col soggetto.

E' pertanto auspicabile una valutazione dei fabbisogni dei principali macro e microelementi e di un loro corretto equilibrio nella dieta.

Le vitamine sono sostanze indispensabili per l'organismo prendendo parte attiva nei più svariati aspetti del metabolismo. Molto eterogenee tra loro, provengono principalmente dalla dieta ed alcune sono anche sintetizzate dalla flora microbica del tratto intestinale (gruppo B e K).

I foraggi freschi, in particolare, sono ricchi di vitamine e, se ben rappresentati nella dieta del cavallo, possono coprire i fabbisogni, almeno per il mantenimento. Spesso però a causa dell'attitudine del soggetto, del lavoro

quotidiano cui viene sottoposto e dell'alimentazione necessariamente ricca di concentrati per soddisfare le aumentate richieste energetiche, è opportuno provvedere all'aumento della razione ed all'equilibrio delle perdite valutando una integrazione per alcune di esse.

## CONCLUSIONI

In conclusione, la dieta ottimale per il cavallo atleta dovrebbe perseguire i seguenti obiettivi:

- fornire l'energia necessaria all'attività richiesta
- fornire perlomeno il minimo dei principi nutritivi necessari
- fornire le quantità ottimali nelle varie proporzioni dei diversi substrati energetici
- facilitare l'utilizzazione di questi substrati
- ridurre il peso e l'ingombro del contenuto intestinale
- mantenere l'idratazione corporea
- tamponare l'acidità prodotta a livello intestinale e muscolare

La migliore conoscenza dei fabbisogni nutrizionali propri del cavallo atleta ci consente quindi di formulare delle razioni sempre più adeguate e personalizzate per i vari tipi di sforzo e per i singoli animali tali da permettere la valorizzazione del potenziale genetico, l'attuazione di piani di allenamento più rigorosi e quindi un miglioramento delle performances sportive.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Costill D.L., Coyle E., Dalsky D. et al. (1977) - "Effects of elevated plasma FFA and insulin on muscle glycogen usage during exercise." J. Appl. Phys. 43, 695.
- 2) Cutmore C.M.M., Snow D.H., Newsholme E.A. (1986) - "Effects of training on enzyme activities involved in purine nucleotide metabolism in thoroughbred horses." Eq. Vet. J., 18 (1), 72-73.
- 3) Duren S.E., Jackson S.G., Baker J.P. et al (1987) - "Effects of dietary fat on blood parameters in exercised Thoroughbred horses" in Gillespie J., Robinson N.E. (eds.): Equine Exercise Physiology, vol. 2 Davis, CA, ICEEP Publications, 674.
- 4) Essen B., Lindholm A., Thornton J. (1980) - "Histochemical properties of muscle fibre types and enzyme activities in skeletal muscle of standardbred trotters of different ages." Eq. Vet. J. 12, 175-180.
- 5) Essen-Gustavsson B., Valberg S. (1987) - "Blood ammonia concentrations in horses during treadmill work and after racing". in Gillespie J., Robinson N.E. (eds.): Equine Exercise Physiology, vol. 2 Davis, CA, ICEEP Publications, 546.
- 6) Felig P., Wahren J. (1977) - "Interrelationship between amino acid and carbohydrate

- metabolism during exercise: the glucose alanine cycle.*" in Pernow B., Saltin B. (eds.): Muscle metabolism during exercise. New York, Plenum Press, 205.
- 7) Gatta D., Magni L., Cecchi L. (1994) a - "*Il razionamento dei purosangue in attività nel centro di allenamento di S. Rossore.*" Quaderni di Ippologia Giacinto Fogliata. Tacchi Editore, Pisa.
  - 8) Gatta D., Casini L., Magni L., Colombani B. (1994) b - "*Ingestione di sostanza secca, energia digeribile e proteina grezza in purosangue in attività.*" Atti Convegno S.I.S.Vet., Giardini Naxos, in corso di stampa.
  - 9) Gollnick P.D., Saltin B. (1988) - "*Fuel for muscular exercise: role of fat.*" in Horton E.S., Terjung R.L. (eds.): Exercise, Nutrition and Energy Metabolism. New York, Macmillan, 72.
  - 10) Hambleton P.L., Slade L.M., Hamor D.W. et al. (1980) - "*Dietary fat and exercise conditioning effect on metabolic parameters in the horse.*" J. Anim. Sci., 51, 1330.
  - 11) Harris R.C., Marlin D.J., Snow D.H. (1987) - "*Metabolic response to maximal exercise of 800 and 2000 metres in the thoroughbred horse.*" J. Appl. Physiol., 63, 12.
  - 12) Henckel P. (1983) - "*Training and growth induced alteration in the middle gluteal muscle of young standardbred trotters.*" Eq. Vet. J., 15, 134-140.
  - 13) Hintz H.F., Ross M., Lesser F. et al. (1977) - "*Dietary fat for working horses.*" Cornell Nutrition Conference, Ithaca, NY, 87.
  - 14) Lawrence L.M. (1990) - "*Nutrition and fuel utilization in the athletic horse.*" Vet. Clin. of North America: Equine Practice, vol. 6 n° 2, August.
  - 15) Mackie B.G., Dudley G.A., Kacimba-Uscilko H. et al. (1980) - "*Uptake of chylomic triglycerides by contracting skeletal muscle in rats.*" J. Appl. Physiol., 61, 1180.
  - 16) Massicotte D., Peronnet F., Allah C. et al. (1986) - "*Metabolic response to C. glucose and C. fructose ingestion during exercise.*" J. Appl. Physiol., 61, 1180.
  - 17) Maughan R.J., Gleeson M. (1988) - "*Influence of a 36 h fast followed by refeeding with glucose, glycerol or placebo on metabolism and performance during prolonged exercise in man.*" Eur. J. Appl. Physiol., 57, 570.
  - 18) McMiken D.F. (1988) - "*An energetic basis of equine performance.*" Eq. Vet. J., 15 (2), 12.
  - 19) Meyer H. (1987) - "*Nutrition of the equine athlete.*" in Gillespie J., Robinson N.E. (eds): Equine Exercise Physiology, vol. 2 Davis, CA, ICEEP Publications, 650-665.
  - 20) Meyers M.C., Polter G.D., Grene L.W. et al. (1987) - "*Physiological and metabolic response of exercising horses to dietary fat.*" Proc. 10th Eq. Nutr. Soc., Fort Collins, Colorado, 107.
  - 21) Miller P.A., Lawrence L.M. (1986) - "*Changes in equine metabolic characteristics due to exercise fatigue.*" An. J.Vet. Res., 47, 2184.
  - 22) Miller P.A., Lawrence L.M. (1988) - "*The effect of dietary protein level on exercising horses.*" J. Anim. Sci., 66, 2185.
  - 23) Nimmo M.A., Snow D.H. (1981) - "*Changes in muscle glycogen, lactate and pyruvate concentrations in the thoroughbred horse following maximal exercise.*" in Gillespie J., Robinson N.E. (eds): Equine Exercise Physiology, vol. 2 Davis, CA, ICEEP Publications, 237.
  - 24) National Research Council (1989) - "*Nutrient requirements of horses.*" 5th ed., Washington D.C., National Academy Press.

- 25) Oldham S.L., Potter G.D., Evans J.W. et al. (1989) - "*Storage and mobilization of muscle glycogen in racehorses fed a control and high fat diet.*" Proc. 11th Eq. Nutr. Physiol. Soc., Stillwater, Oklahoma, 57.
- 26) Pagan J. (1992) - "*Exercise physiology: ATP production and conditioning of the Racehorse.*" Thoroughbred, December, 4,18-20.
- 27) Pagan J., Jackson S.G. (1992) - "*Think energy when feeding the racehorse.*" Hoofbeats, October, 105-106.
- 28) Paul P., Issekurtz B.(1967) - "*Role of extramuscular energy sources in the metabolism of the exercising dog.*" J. Appl. Physiol., 22, 615.
- 29) Roberts M.C. (1974) - "*Amylase activity in the small intestine of the horse.*" Res. Vet. Sci., 17, 400-401.
- 30) Saltin B., Gollnick P.D. (1988) - "*Fuel for muscular exercise: role of carbohydrate.*" in Horton E.S., Terjung R.L. (eds): Exercise, Nutrition and Energy Metabolism. New York, Macmillan Press, 45.
- 31) Slade D.H., Lewis L., Quinn C.R., Challdlel M.L. (1975) - "*Nutritional adaptation of horses for endurance performance.*" Proc. 4th Eq. Nutr. Physiol. Soc., 114-128.
- 32) Snow D.H. (1984) - "*Exercise and training.*" in Hickman J., Horse management. Ac. Press N.Y., 306.
- 33) Weiss M., Krauter T.H., Graff K.H., Abmayr W., Weicker H. - "*Iron pathway and iron loss in different forms of training and the origin of sportanemie.*" 28th Meeting of the German Society of Sports Medicine. Abst., in: Int. J. Sports Med., 4, 64.
- 34) Winder W.W. (1985) - "*Control of hepatic glucose production during exercise.*" Med. Sci. Sports Exerc., 17, 2.
- 35) Wolter R. (1991) - "*Dietetique du cheval athlete.*" P.V.E., vol. 23: (n° 3, 19-31); (n°4, 13-22).
- 36) Wolter R. (1993) - "*Les fibres dans l'alimentation du cheval.*" P.V.E., vol. 25, 1, 45-49.

# PATOLOGIA NUTRIZIONALE - MODIFICAZIONI DEL PROFILO METABOLICO

BUONACCORSI A.

*Istituto di Clinica Medica Veterinaria, Pisa*

Quando un cavallo che in precedenza ha dimostrato di possedere buone capacità atletiche, manifesta una riduzione delle prestazioni e le indagini cliniche escludono disturbi muscolo-scheletrici, respiratori, cardiaci o infezioni croniche, nel tentativo di giungere ad una diagnosi é frequente il ricorso a test di laboratorio non suggeriti da dati obiettivi ma scelti secondo la routine. Il più delle volte essi sono l'esame emocromocitometrico, approfondito poi secondo i risultati, l'analisi del ricambio minerale, circoscritta al calcio e al fosforo, di aspetti limitati del bilancio idro-elettrolitico (sodio e potassio), di profili d'organo del fegato, del muscolo scheletrico (GOT, CK, lattato) e cardiaco ( $\alpha$ -HBDH o isoenzima LDH 1, elettrocardiogramma a riposo e dopo il lavoro) e, in qualche caso, del rene. E' ignorato quasi del tutto, invece, un "profilo" che esamini il comportamento di metaboliti le cui alterazioni non prendano origine da *patologie della nutrizione* di senso carenziale e nella diagnosi delle quali la *medicina clinica* deve collaborare strettamente con la *medicina di laboratorio*. Questa indica i test successivi ai primi responsi della chimica clinica in grado di chiarire le cause della sindrome in esame. E' quanto accade nella "sindrome di minor rendimento" legata a *dispepsie intestinali idiopatiche ad andamento subclinico*.

Le dispepsie, o difficoltà di digestione, che interessano sono la fermentativa o acidificante e la putrefattiva o alcalinizante di origine alimentare (8); la prima da eccesso di carboidrati facilmente fermentescibili aggravata sovente dall'ulteriore aggiunta di destrosio dopo un lavoro più impegnativo del solito; la seconda da eccesso di proteine. Nella fermentativa il substrato ricco in carboidrati modifica l'ecosistema all'altezza del grosso intestino dove é favorito lo sviluppo della flora batterica saccarolitica con predominio dei lattobacilli e quindi ad azione prevalentemente acidificante. La conseguenza é la produzione sopra la norma di acido lattico e degli acidi grassi volatili butirrico e acetico. Nella forma contenuta la produzione del

lattato, degli acidi grassi volatili e pure dei gas di fermentazione acido carbonico e metano, non é così elevata da provocare flogosi importante della mucosa enterica con la loro azione irritante, però le feci non hanno la consistenza solita per l'azione osmotica dei glucidi e dell'acido lattico che trattiene acqua nel lume intestinale. L'anamnesi può riferire di episodi di colica spasmodica. Nella putrefattiva l'abbondanza di proteine modifica l'ecosistema del grosso intestino dove viene a prevalere gradualmente la flora batterica proteolitica alcalinizzante con produzione di ammoniaca, più tardi di mercaptani, idrogeno solforato, istamina, indolo, scatolo, putrescina e cadaverina che si potranno rendere responsabili di lesioni organiche a varia localizzazione. Ci possono essere stipsi e dolori colici ricorrenti.

La coesistenza del calo della performance e di eventuali disturbi intestinali invita ad approfondire l'anamnesi sul tipo di alimentazione che indirizza ad effettuare un profilo metabolico, con le metodiche colorimetriche della chimica clinica e con l'emogas-analisi, nell'ipotesi di una condizione di acidosi o di alcalosi da cause alimentari.

Gli aspetti metabolici nel momento preclinico sono di un'acidosi e di un'alcalosi compensate:

#### ACIDOSI NON ACIDEMICA

Emoconcentrazione modesta

Ematocrito (Ht) (32-46%)	Ht 48%
Proteine totali (P.T.) (5.5 -7.5 g/dl),	P.T.7,7 g/dl
pH ematico (7.35-7.40)	Leggermente diminuito
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ( 23.7-27.1 mEq/l )	Lieve riduzione
L-lattato (5,36-16.96 mg/dl)	Aumento
Piruvato (0,10-0,54 mg/dl)	Aumento
Glucosio (60-100 mg/dl)	Aumento
Urea (20-40 mg/dl)	Normale
Creatinina ( fino a 2 mg/dl)	Normale

#### ALCALOSI NON ALCALEMICA

pH ematico	Leggermente aumentato
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Aumento lieve
NH <sub>3</sub> ( 1,2-5,7 µg/dl)	Aumento

Gli altri elementi ricavati dall'emogas-analisi che permettono d'inquadrare più compiutamente la situazione metabolica nell'acidosi compensata sono:  $p\text{CO}_2$  leggermente diminuita ( $< 42$  mmHg), divario anionico, o gap anionico, e cloro normali; nell'alcalosi compensata:  $p\text{CO}_2$  aumentata di poco ( $> 43$  mmHg). I dati ottenuti non giustificano compiutamente il minor rendimento atletico, la presenza però delle variazioni del pH, dell'aumento ematico del lattato e dell'ammoniaca indirizzano, seguendo le acquisizioni della medicina di laboratorio, ad accertare i tassi sierici del magnesio, del calcio e del fosforo. Mentre la calcemia e la fosforemia sono nella norma, non così la magnesiemia che si rinviene al di sotto del minimo fisiologico ( $< 0,70$  mmol/l) non in quantità tale da provocare fatti di eccitabilità neuro-muscolare nel qual caso ci sarebbero ipocalcemia e iperfosforemia dovute a refrattarietà del paratormone poiché il magnesio è essenziale alla biosintesi e/o liberazione di questo (6), ma in grado comunque di produrre, pur se la sua deficienza è "marginale" e la magnesiemia non riflette in modo preciso la concentrazione intracellulare (6), una minore resa del lavoro muscolare. Il muscolo scheletrico e il cardiaco è tra i tessuti dove il  $\text{Mg}^{2+}$  endocellulare ha la concentrazione maggiore perché la sua attività metabolica è elevata e il catione è indispensabile alla produzione, utilizzazione e messa in riserva dell'energia intervenendo come attivatore delle fosforilazioni e della risintesi dell'adenosintrifosfato (ATP) (3,4). Ricordiamo, a tal proposito, che nel sistema " creatina- fosfocreatina" il quale controlla la sintesi e l'impiego dell'ATP, la reazione è catalizzata dalla *creatina chinasi* e richiede la presenza di ioni di  $\text{Mg}^{2+}$  dal momento che i substrati dell'enzima predetto non sono ADP e ATP sibbene i loro complessi con il  $\text{Mg}^{2+}$ :  $\text{creatina} + \text{Mg}^{2+} - \text{ATP} \rightleftharpoons \text{fosfocreatina} + \text{Mg}^{2+} - \text{ADP}$  (7). Le cause che nell'acidosi e nell'alcalosi compensate abbassano la magnesiemia sono principalmente l'aumento del lattato che chela il magnesio e l'elevata acidità dell'urina che aumenta la magnesiuuria nella prima; l'ammoniaca, i suoi derivati e l'alcalinità eccessiva del mezzo che riducono l'assorbimento intestinale del catione nella seconda. Altro fattore che può aggravare l'omeostasi del magnesio è lo stress, sia da dismetabolismo sia da lavoro fisico gravoso in condizioni di forma precaria, a causa dell'iperincrezione di catecolamine lipolitiche, degli ormoni magnesiuurizzanti tiroxina, adiuretina e cortisolo, per l'iposecrezione d'insulina e la perdita urinaria di taurina. Nella lipolisi i grassi non esterificati chelano il magnesio e gli adipociti lo sequestrano, l'insulina e la taurina aumentano il magnesio cellulare mentre l'adrenalina, forse per beta-stimolazione, lo riduce (4). Il deficit magnesiacco, anche se relativo,

crea poi uno stato di condizionamento che favorisce la suscettibilità allo stress e si viene così a creare un "circolo vizioso" (4). In ultimo non é da sottovalutare che la difficoltà energetica rende problematica l'omeostasi del magnesio perché la diffusione di esso tra ambiente extra ed intracellulare é glucido-dipendente e il catione é indispensabile all'attività di molti enzimi del metabolismo glucidico ( ad es. per gli enzimi glicolisi esochinasi, fosfofruttochinasi, aldolasi, fosfogliceratochinasi, fosfogliceromutasi, enolasi, piruvato chinasi). ATP e  $Mg^{2+}$  inoltre hanno il compito di preservare l'integrità funzionale e strutturale delle membrane cellulari. Quando il contenuto di ATP e di  $Mg^{2+}$  scende sotto una concentrazione critica per consumo, come nell'esercizio muscolare impegnativo, la permeabilità della membrana é più o meno intensamente alterata. Dal miocita pertanto fuoriescono adenin-nucleotidi e il NAD ( nicotinammide adenin-nucleotide, coenzima di deidrogenasi dei mitocondri cellulari), alcuni enzimi (GOT, LDH, CK) e lo stesso  $Mg^{2+}$  che si disperde ulteriormente (7).

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Buonaccorsi A., Corazza M., Guidi G., Tognetti R. - *"Indebolimento" della funzione epatica e "non rendimento" nel cavallo atleta*. Ann. Fac. Med. vet. Pisa, XI.V. 259-279, 1992
- 2) Brown M.C. - *Problemi in medicina equina*. SBN Noceto (Parma) 1991.
- 3) Diez O., Wiesner E. - *Disease of the horse*. Part 2/II, 357-358, Karger Basel (CH), 1984
- 4) Durlach J. - *Il magnesio nella pratica clinica*. Ipsa Edit. Palermo, 1988
- 5) Ingraham R.H., Kappel L.C. - *Metabolic profile testing* - Vet. Clin. North Amer. 391-411, Vol.4/N.2, W.B. Saunders Comp. Phil-Lond, 1988
- 6) Pasero G., Giordani R. - *Semeiologia e diagnostica funzionale*. Editrice Ambrosiana Milano, 1985
- 7) Siliprandi N. - *Biochimica medica*. - Piccin Edit. 1988.
- 8) Tradati F., Belloli A., Ferro E. - *Argomenti di Patologia Medica degli animali domestici*. Apparato digerente. Soc. Ed. Esculapio Bologna 1986.
- 9) Venturoli M., Ferrari G. - *Comportamento della lattacidemia, del piruvato ematico e delle curve cardiorespiratorie in cavalli trottatori durante l'allenamento*. Clin. Vet., 100, 298-307, 1977.

# LA PATOLOGIA NEOPLASTICA NEGLI EQUINI

## Rassegna bibliografica e contributo casistico

BETTINI G., BOVENGA F.,  
MARCATO P.S.

*Istituto di Patologia Generale e Anatomia Patologica Veterinaria, Bologna  
Facoltà di Medicina Veterinaria, Bologna*

### INTRODUZIONE

Nella patologia equina le neoplasie vengono generalmente considerate poco frequenti. Uno studio condotto in Gran Bretagna da Baker ed Ellis (1981) indica che i tumori rappresentano per i cavalli la causa principale di morte solo nel 6% dei casi (29/472). Una ricerca condotta in Polonia (Lis, 1993) su 28.922 cavalli normalmente macellati ha evidenziato un'incidenza di lesioni neoplastiche pari allo 0,45%, mentre nell'ambito delle varie patologie riscontrate (4627 = 16%) le neoplasie incidono per un 2,8%.

Gli studi specifici condotti sull'argomento offrono tuttavia risultati piuttosto discordanti, fornendo valori di incidenza che complessivamente variano dallo 0,1% al 18% (tabella 1). Queste notevoli differenze possono essere però ridimensionate se si considerano le modalità con cui sono stati raccolti i dati nei singoli studi:

- *studi condotti al macello* prevalentemente su animali giovani e/o clinicamente sani: incidenza variabile dallo 0,1% allo 0,45% (Brandly e Migaki, 1963; Misdorp, 1967; Lis, 1993);

- *studi condotti presso dipartimenti clinici* sugli animali ricoverati: incidenza variabile dall'1,75% al 3,5% (Uberreiter, 1960; Panndorf, 1970; Priester e Mantel, 1971; Cotchin, 1977; Zanichelli et al., 1994);

- *studi condotti presso dipartimenti di anatomia patologica* su cavalli deceduti o su campioni inviati per l'esame istologico: incidenza variabile dal 12,6% al 18% (Kerr e Alden, 1975; Sundberg et al., 1977). In questi studi, scomponendo i dati, si evidenzia un'incidenza delle neoplasie del 3,1-4,4% nell'ambito delle necropsie e del 26-33,9% nei riscontri istologici di prelievi chirurgici (biopsie o escissionali), evidenziando quindi che il sospetto di una forma neoplastica è uno dei principali motivi per cui il clinico ricorre

Tabella I - Incidenza delle neoplasie negli equini. Dati della letteratura

Autori	Periodo considerato	Paese	Fonte dei dati	Numero di cavalli esaminati	Numero di neoplasie registrate	Incidenza delle neoplasie
Sundberg, 1977	1970-1974	USA	Patol.	1.322	236	18%
Kerr e Alden, 1975	1964-1973	USA	Patol.	2.250	282	12,60%
Cotchin, 1977	1966-1975	Gran Bretagna	Clinica	2.765	86	3%
Panndorf, 1970	1950-1965	Germania	Clinica	9.782	173	1,75%
Uberreiter, 1960	-	Austria	Clinica	11.400	342	3%
Priester e Mantel, 1971	1964-1969	USA e Canada	Clinica	38.207	965	2,90%
Zanichelli et al., 1994	1989-1993	Italia	Clinica	1.211	42	3,47%
Misdorp, 1967	1960-1965	Olanda	Macello	20.000	28	0,10%
Lis, 1993	1990	Polonia	Macello	28.922	133	0,45%
Brandly e Migaki, 1963	1955-1962	USA	Macello	963.600	487	0,10%

ad un esame istologico.

Rispetto alle altre specie di animali domestici, le neoplasie sembrano incidere negli equini in misura inferiore (tabella II), rappresentando solo il 5-10% delle neoplasie comunemente diagnosticate nei laboratori di patologia veterinaria. Questo dato è però di ben poco significato se non viene ponderato sulla composizione relativa della popolazione animale di origine. I veri studi di epidemiologia dei tumori sono però rari in veterinaria, ed ancor più raramente prendono in considerazione anche i cavalli. L'unico studio cui è possibile far riferimento è quello del National Cancer Institute nordamericano (Priester e McKay, 1980) (tabella III) da cui risulta, considerando tutte le neoplasie nel loro insieme, un'incidenza dei tumori sostanzialmente analoga fra equini, bovini e gatti (1,43-1,36-1,45%) rispetto al cane (3,33%), con il distinguo, per i cavalli, di una significativa minore incidenza delle neoplasie maligne, che effettivamente risulta anche dalla maggior parte delle casistiche sopra citate.

Anche la determinazione dei siti preferenziali di insorgenza può risultare notevolmente condizionata dalla metodologia di raccolta dei dati (tabella IV). Negli studi condotti al macello (Cotchin e Baker-Smith, 1975; Damodaran e Ramachandaran, 1986; Lis, 1993) le neoplasie più frequenti risultano infatti quelle della tiroide, del surrene ed i melanomi, mentre nelle indagini basate sullo studio di campioni provenienti da dipartimenti clinici (Uberreiter, 1960; Panndorf, 1970; Priester e Mantel, 1971; Baker e Leyland, 1975; Kerr e Alden, 1975; Cotchin, 1977; Sundberg et al., 1977; Krüiger, 1979; Priester e McKay, 1980; Bastianello, 1983; Haghdoost e Zakarian, 1980; Zanichelli et

al., 1994) la stragrande maggioranza delle neoplasie è rappresentata dai tumori dell'apparato cutaneo, ed in particolare dal sarcoide (più frequente neoplasia benigna), dal carcinoma squamocellulare (più frequente neoplasia maligna) e dal melanoma. Nelle stesse casistiche i tumori dell'apparato genitale occupano spesso il secondo posto e sono rappresentati, oltre che da una cospicua quota di carcinomi squamocellulari dei genitali esterni, dai tumori dell'ovaio a cellule della granulosa nelle femmine e dai seminomi nei maschi.

**Tabella II** - Ripartizione relativa delle neoplasie in diverse specie di animali domestici

Autori	Periodo considerato	Paese	Neoplasie esaminate	Ripartizione percentuale delle neoplasie nelle varie specie					
				Equini	Bovini	Suini	Ovicapriini	Cane	Gatto
Baptista e Silva, 1985	1878-1983	Portogallo	659	12,3	25	0,6	2,9	52,5	6,6
Smith e Jones, 1957	1936-1955	USA	7.052	5,4	13,5	1,9	1,7	75,3	1,9
Krüger, 1975	1955-1975	Germania	2.421	5,2	20,1	3,9	0,4	67,2	3,1
Priester e Mantel, 1971	1964-1969	USA e Canada	5.182	10,2	9,6	0,4	0,4	72,8	6,6
Priester e McKay, 1980	1963-1977	USA e Canada	23.405	9,5	6,3	-	-	74,5	9,7
Nobel et al., 1979	1969-1979	Israele	709	1,5	51,4	0,2	14,5	32,1	0,9
Singh et al., 1991	1980-1988	India	198	4,5	75,2	-	-	20,2	-
Ramakrshnan e Manohar, 1980	1940-1978	India	3.894	1,4	73,7	-	0,8	24	-
Cotchin, 1960	1950-1960	Gran Bretagna	452	19,9	64,8	5,9	9,2	-	-
Plummer, 1956	1951-1955	Canada	495	2,8	90,3	5,6	1,2	-	-
Brandly e Migaki, 1963	1955-1962	USA	480.447	0,1	95,6	3,9	0,4	-	-
Misdorp, 1967	1960-1965	Olanda	333	11,4	69,3	9,6	9,6	-	-

**Tabella III** - Incidenza delle neoplasie in bovini, equini, cani e gatti secondo il *National Cancer Institute (Priester e McKay 1980)*

Popolazione di riferimento	Equini 155.259		Bovini 107.654		Cani 523.706		Gatti 157.581	
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
Neoplasie benigne	877	0,56%	272	0,25%	5821	1,11%	195	0,12%
Neoplasie maligne	886	0,57%	1133	1,05%	9762	1,86%	2012	1,28%
Neoplasie MND	457	0,29%	64	0,06%	1852	0,35%	74	0,05%
Tutte le neoplasie	2220	1,43%	1469	1,36%	17435	3,33%	2281	1,45%

MND = malignità non determinata

Fra le neoplasie maligne il linfosarcoma risulta la più frequente neoplasia ad esito mortale (Baker ed Ellis, 1981) ed a coinvolgimento multiorganico (Sweeney e Gillette, 1989; Mair e Brown, 1993).

L'influenza di sesso ed età sullo sviluppo delle neoplasie è stata valutata con accuratezza soltanto nello studio del NCI (Priester e McKay, 1980). Le neoplasie benigne mostrano una uguale frequenza nei due sessi, con un rischio di insorgenza nell'animale adulto pressochè costante per tutta la vita (figura 1-1), eccezion fatta per un certo incremento del rischio oltre i 12 anni a causa della più probabile insorgenza oltre questa età degli adenomi tiroidei e dei lipomi. Il rischio di sviluppare neoplasie maligne (figura 1-2) tende invece ad aumentare con l'età, mantenendo il maschio un costante maggior rischio rispetto alla femmina a causa del relativamente frequente sviluppo del carcinoma squamocellulare in localizzazione peniena dopo il nono anno. Il melanoma tende a manifestarsi con particolare frequenza nei cavalli che hanno superato i 15 anni di vita.

L'apparente predisposizione allo sviluppo di neoplasie del Quarter Horse segnalata da alcune casistiche è in realtà da imputare alla grande diffusione di questa razza negli Stati Uniti (Kerr e Alden, 1975, Junge et al., 1984). Lo studio del NCI (Priester e McKay, 1980), ponderato sulla composizione razziale della popolazione di riferimento, ha evidenziato un maggior rischio per lo sviluppo di neoplasie maligne nelle razze Belga ed Appaloosa (in particolare per il carcinoma squamocellulare), nel Pinto, nel mulo, e, limitatamente

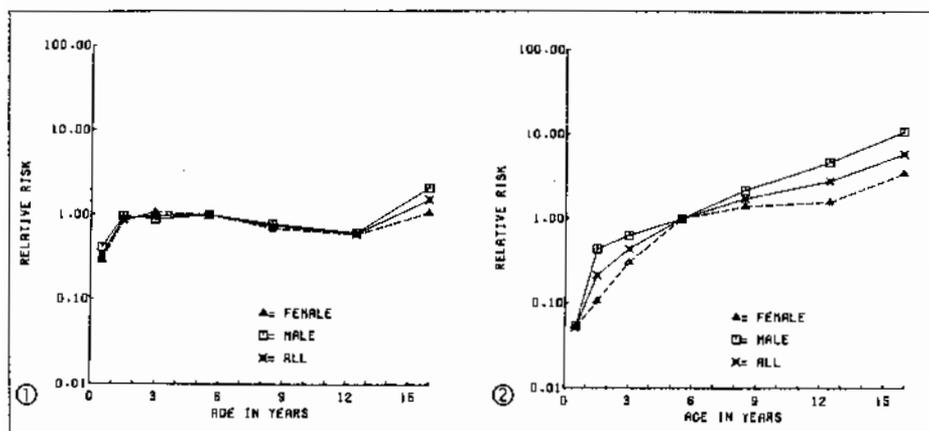


Figura 1 - Rischio relativo delle neoplasie benigne (1) e maligne (2) negli equini stimato secondo l'età ed il sesso. Dati del *National Cancer Institute*.

Tabella IV - Tipi istologici più frequenti nell'ambito delle neoplasie equine.  
Dati della letteratura.

Tipa istologica	Baker e Leyland, 1975	Kerr e Alden, 1975	Sundberg et al., 1977	Pascoe e Summers, 1981	Bastionello 1983	Haghdoust e Zokarian 1985	Priester e McKay 1980	Krüger, 1979	Catchin e Baker- Smith, 1975
Sarcoide	13%	39%	44%	28%	38%	10%	0	0	1%
Fibroma/fibrosarcoma	39%	1%	3%	3%	12%	34%	26%	22%	0
Papilloma	9%	0	6%	1%	5%	5%	17%	2%	1%
Carcinoma squamocellulare	15%	12%	25%	37%	24%	7%	25%	14%	1%
Melanoma	5%	6%	4%	7%	8%	34%	5%	10%	9%
Tumore a cellule della granulosa	1%	5%	3%	5%	0	0	4%	0	2%
Seminoma	0	0	1%	0	0	2%	1%	0	0
Lipoma/liposarcoma	1%	6%	3%	1%	2%	0	3%	1%	13%
Linfosarcoma	5%	3%	1%	1%	3%	2%	3%	7%	3%
Adenoma/carcinoma della tiroide	0	2%	1%	0	1%	0	2%	0	47%
Altri	14%	27%	12%	16%	8%	5%	16%	44%	23%
Totale neoplasie esaminate	124	233	236	149	378	41	2220	127	151

ai melanomi ed ai tumori dell'ovaio a cellule della granulosa, nella razza Araba. La predisposizione di questa razza al melanoma è però da intendersi non come una vera predisposizione razziale su base genetica, quanto invece da collegare alla frequenza del mantello bianco e grigio nello standard della razza (Mullowney, 1985).

### MATERIALI E METODI

E' stata condotta un'indagine retrospettiva sulle neoplasie equine archiviate presso l'Istituto di Patologia Generale e Anatomia Patologica Veterinaria dell'Università di Bologna negli anni compresi fra il 1935 e il 1994. In particolare, la casistica proviene da tre fonti principali:

1) 972 necroscopie, eseguite nella Sala Anatomica dell'Istituto su equini provenienti dagli Istituti Clinici della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Bologna o da privati;

2) 182 campioni chirurgici, esiti di prelievi biotici o interventi eseguiti presso gli Istituti Clinici della Facoltà o da veterinari liberi professionisti;

3) 433 organi isolati pervenuti all'Istituto per accertamenti diagnostici dal Pubblico Macello di Bologna o da altri macelli.

La consultazione di 1590 fra referti necroscopici e descrizioni anatomopatologiche ha consentito di individuare 270 casi che erano

macroscopicamente riferibili a neoplasie.

A partire dai campioni selezionati, fissati in formalina, alcool, o Ruffini 3, ed inclusi in paraffina, sono state allestite sezioni istologiche che sono state colorate con l'ematossilina-eosina e, quando necessario, con altri metodi (PAS, tricromica di Masson, colorazione di Gomori per le fibre reticolari, ecc.).

Nei casi in cui l'esame istologico ha confermato la diagnosi macroscopica di neoplasia, questa è stata classificata applicando i criteri previsti dall'Organizzazione Mondiale della Sanità per i tumori spontanei degli animali domestici (WHO, 1974, 1976). I dati ottenuti sono stati successivamente classificati, oltre che per tipo istologico, per localizzazione anatomica, e per grado di benignità o malignità istologica. I dati relativi a sesso, età e razza degli animali selezionati non sono risultati disponibili per tutti i casi.

## RISULTATI

L'esame istologico ha confermato la diagnosi macroscopica di neoplasia in 168 dei 270 casi selezionati. Rispetto alla totalità dei 1590 cavalli esaminati nell'Istituto, le neoplasie confermate istologicamente incidono pertanto per il 10,57%. Più in particolare (tabella V) è stata rilevata un'incidenza del 3,5% (34/972) nell'ambito delle necroscopie, del 29,67% (54/182) fra i prelievi biotici e del 18,35% (80/436) fra gli organi isolati pervenuti all'Istituto per accertamenti diagnostici.

I tumori più frequenti (tabella VI) sono risultati il sarcoide (17%), il linfosarcoma (16%) ed il melanoma (10%).

Delle 168 neoplasie esaminate, 64 (38%) sono risultate istologicamente benigne, 104 (62%) maligne.

Tabella V - Equini esaminati presso l'Istituto di Patologia Generale e Anatomia Patologica Veterinaria dell'Università di Bologna e frequenza delle neoplasie istologicamente confermate. Dati raggruppati secondo la fonte di provenienza.

Fonte	N°	Neoplasie	%
Necroscopie	972	34	3,50%
Prelievi chirurgici	182	54	29,67%
Organi isolati provenienti dal macello	436	80	18,35%
Totale	1590	168	10,57%

Tabella VI - Classificazione istologica di 168 neoplasie equine.

Diagnosi	n°	Percentuale
Sarcoide	28	17%
Linfoma	27	16%
Melanoma	17	10%
Adenoma e carcinoma renale	12	7%
Fibroma e fibrosarcoma	12	7%
Emangioma, emangiosarcoma ed emangiopericitoma	11	7%
Seminoma	6	4%
Carcinoma squamocellulare	6	4%
Carcinomi epatocellulari	5	3%
Colangiocarcinomi	5	3%
Leiomioma e leiomiomasarcoma	5	3%
Adenomi e carcinomi tiroidei	5	3%
Tumore dell'ovaio a cellule della granulosa	5	3%
Adenomi e carcinomi corticosurrenali	4	2%
Feocromocitomi	4	2%
Adenocarcinomi polmonari	3	2%
Plasmocitoma	2	1%
Schwannoma	2	1%
Adenocarcinoma pancreatico	1	1%
Adenocarcinoma seni frontali	1	1%
Adenoma ipofisario	1	1%
Carcinoma della mammella	1	1%
Carcinoma vescicale a cellule transizionali	1	1%
Lipoma	1	1%
Mesotelioma	1	1%
Papilloma	1	1%
Rabdomioma	1	1%
Totale	168	

Da un punto di vista istogenetico (tabella VII) si è rilevata la predominanza dei tumori di derivazione mesenchimale (35%) che, se considerati separatamente dai tumori derivati dai tessuti emopoietici (17%), sono risultati per la maggior parte istologicamente benigni. I tumori di tipo epiteliale (27%) e quelli di derivazione neuroectodermica (14%) erano invece generalmente maligni a causa dell'elevata percentuale di carcinomi nei primi e di melanomi nei secondi.

La predominanza delle neoplasie di origine mesenchimale è da mettere in relazione alla elevata frequenza del sarcoide e delle altre neoplasie fibroconnettivali. Ben rappresentate anche le neoplasie di derivazione endoteliale e muscolare, mentre è risultata inferiore alle aspettative teoriche

Tabella VII - Classificazione istogenetica di 168 neoplasie equine.

Origine	Benigni		Maligni		Totale	
	N°	%	N°	%	N°	%
Epiteliale	9	20,00%	36	80,00%	45	26,79%
Mesenchimale*	48	81,36%	11	18,64%	59	35,12%
Dai tessuti emopoietici	-	-	29	100,00%	29	17,26%
Neuroectodermica**	2	8,33%	22	91,67%	24	14,29%
Altre***	5	45,45%	6	54,55%	11	6,55%
Totale	64	38,10%	104	61,90%	168	

\* escluse le neoplasie derivate dai tessuti emopoietici

\*\* compresi i melanomi

\*\*\* neoplasie di origine gonadostromale (tumori dell'ovaio a cellule della granulosa) e germinale (seminomi testicolari)

l'incidenza dei lipomi, assenti dalla nostra casistica nella loro localizzazione mesenteriale. Frequenti, invece le neoplasie dei tessuti emopoietici (17%), rappresentate pressochè esclusivamente da linfomi.

Le neoplasie epiteliali più comuni sono risultate i carcinomi squamocellulari e gli adenomi o carcinomi renali, epato/colangiocellulari, tiroidei e corticosurrenali. Come già detto, infine, la non trascurabile rappresentanza di neoplasie di derivazione neuroectodermica è da ascrivere quasi integralmente alla quota di tumori melanotici.

Quanto alle localizzazioni anatomiche (tabella VIII), l'apparato più colpito è risultato quello cutaneo (38%) (tabella IX), seguito dall'emopoietico (19%) (tabella X), dal digerente (13%) (tabella XI) e dal genitale (12%) (tabella XII).

Tabella VIII - Classificazione di 168 neoplasie equine secondo l'apparato di insorgenza

Apparato	n°	%	Benigni	Maligni
Cutaneo	57	37,75%	36	21
Emopoietico	29	19,21%	-	29
Digerente	20	13,25%	5	15
Genitale	18	11,92%	10	8
Endocrino	14	9,27%	7	7
Urinario	13	8,61%	1	12
Respiratorio	8	5,30%	1	7
Altri	9	5,96%	4	5
Totale	168		64	104

Tabella IX - Classificazione istologica di 57 neoplasie equine a localizzazione cutanea

Tipo Istologico	N°	Localizzazione			NR*	Metastasi
		Testa	Tronco	Arti		
Sarcoide	28	6	7	4	11	-
Fibroma	3		1	1	1	-
Fibrosarcoma	1				1	-
Schwannoma	1	1				-
Melanoma	17		6		11	14
Papilloma	1				1	-
Carcinoma squamocellulare**	1	1				-
Emangioma	1		1			-
Emangiosarcoma	2	2				-
Emangiopericitoma	1		1			-
Lipoma	1		1			-
<b>Totale</b>	<b>57</b>	<b>10</b>	<b>17</b>	<b>5</b>	<b>25</b>	

\* NR: sede non registrata

\*\* cui si devono aggiungere 3 carcinomi squamocellulari negli organi genitali esterni e 2 nelle cavità nasali

Tabella X - Classificazione istologica ed anatomica di 29 neoplasie equine derivate dai tessuti emopoietici

Neoplasia	Forma anatomica	N°
Linfosarcoma	Multicentrica	10
	Intestinale	8
	Splenica	6
	Mediastinica	3
Plasmocitoma	Sistemico	2
<b>Totale</b>		<b>29</b>

Tabella XI - Classificazione anatomica ed istologica di 20 neoplasie equine con localizzazione primitiva nell'apparato digerente.

Localizzazione	Tipo Istologico	N°
Cavità Orale	Fibroma	1
	Fibrosarcoma	1
Stomaco	Fibroma	1
	Fibrosarcoma	1
	Leiomioma	1
	Leiomiosarcoma	1
	Leiomiosarcoma	1
Intestino	Leiomiosarcoma	1
	Carcinoma epatocellulare	5
Fegato	Colangiocarcinoma	5
	Adenocarcinoma	1
Pancreas	Fibroma	1
Peritoneo	Fibroma	1
	Schwannoma	1
<b>Totale</b>		<b>20</b>

Tabella XII - Classificazione istologica di 18 neoplasie equine ad insorgenza primitiva nell'apparato genitale

Apparato	N°	Localizzazione	N°	Tipo istologico	N°
Maschile	7	Testicolo	6	Seminoma diffuso	6
		Pene	1	Carcinoma squamocellulare	1
Femminile	11	Ovaio	6	Tumore a cellule della granulosa	5
				Emangioma	1
		Utero	2	Leiomioma	2
		Vagina	3	Carcinoma squamocellulare	2
				Emangioma	1
Totale	18				

## DISCUSSIONE

L'incidenza delle neoplasie negli equini esaminati presso l'Istituto di Patologia Generale e Anatomia Patologica Veterinaria dell'Università di Bologna (10,57%) è risultata nel complesso sovrapponibile a quella riferita da altri studi analoghi condotti all'estero.

Non sorprende la relativa bassa incidenza nell'ambito delle necroscopie (3,5%) confermando per il cavallo la scarsa importanza delle neoplasie come causa primitiva di morte, mentre è risultata più elevata l'incidenza dei tumori nell'ambito dei casi giunti al nostro Istituto per accertamenti diagnostici (29,67% delle biopsie, 18,35% degli organi pervenuti dal macello). Quest'ultimo dato, deducibile anche da altre casistiche (Baker e Leyland, 1975; Kerr e Alden, 1975; Sundberg et al., 1977), sottolinea come le neoplasie rappresentino da un lato una frequente occasione di intervento chirurgico per il cavallo, e dall'altro una frequente fonte di incertezza diagnostica nel caso dell'esame ispettivo post-mortem. È interessante a questo proposito il dato riguardante la conferma istologica di neoplasia nella nostra casistica: l'esame istologico ha infatti evidenziato che su 270 casi macroscopicamente riferibili a neoplasia, ben 102 (37,7%) erano in realtà processi patologici di diversa natura, prevalentemente rappresentati da lesioni infiammatorie di tipo granulomatoso. Già altri Autori (Baker e Leyland, 1975; Pascoe e Summers, 1981) hanno riferito la frequenza delle lesioni granulomatose nella specie equina e la loro importanza nella diagnosi differenziale rispetto ai tumori.

Quanto al grado di malignità, nella nostra casistica si è osservata una prevalenza dei tumori maligni (62%) sui benigni (38%) che contrasta parzial-

mente con quanto è riferito dalle altre indagini, condizionata dalla frequenza dei linfomi, dei melanomi e di alcuni carcinomi.

I dati del nostro studio che maggiormente si discostano da quelli di altre casistiche riguardano soprattutto l'elevata frequenza dei linfomi (16% di tutte le neoplasie osservate) e delle neoplasie renali (7%) ed epatiche (6%). Risultano invece allineate ai dati forniti dagli altri studi la predominanza dei tumori di origine mesenchimale e l'indicazione dell'apparato cutaneo come il più frequentemente interessato da neoplasie, sebbene in quest'ultimo ambito la frequenza dei papillomi e dei carcinomi squamocellulari sia risultata inferiore alle aspettative teoriche.

Non riteniamo tuttavia che queste differenze rivestano una valenza generale, nè tantomeno possano riflettere caratteristiche particolari dell'area geografica considerata.

Il nostro, come del resto gli altri studi citati, non può infatti essere considerato un vero studio epidemiologico, poichè manca dei due requisiti fondamentali richiesti agli studi di questo tipo, e cioè la definizione quantitativa della popolazione che si intende rilevare (nel nostro caso la totalità dei cavalli presenti nella provincia di Bologna nel periodo considerato) e la certezza di aver registrato *tutte* le neoplasie insorte in quel periodo. Gli studi basati sulla classificazione dei casi spontaneamente afferiti ad un Istituto forniscono invece valori di incidenza che nella migliore delle ipotesi possono essere rapportati solo alla totalità estremamente variegata dei soggetti *malati*. A ciò si aggiunga che l'intervento di altri fattori rende spesso i risultati ancor meno rappresentativi della *realtà*. Per esempio nelle casistiche fornite dagli Istituti universitari si rileva costantemente una sovrarappresentazione delle patologie meno comuni e più gravi (Monsein, 1991; Ru, 1994), conseguenza del fatto che ad un Istituto di Anatomia Patologica Veterinaria afferisce quanto si verifica in campo animale di *particolarmente anomalo*, il che non corrisponde certamente a tutto quanto accade di *patologico*. Oltre a questa distorsione "fisiologica" possono intervenire anche altri fattori individuali, la cui portata è ancor più difficilmente quantificabile. Riteniamo per esempio non trascurabile la considerazione che le neoplasie maligne risultate sorprendentemente frequenti nella nostra casistica sono state oggetto di specifiche ricerche del nostro Istituto: linfomi (Della Salda e Marcato, 1990), carcinomi epatici (Nunes Petisca, 1957) e carcinomi renali (Di Domizio, 1948; Bettini, 1991).

Al contrario il numero di neoplasie cutanee registrate è incredibilmente esiguo se paragonato all'estensione temporale della casistica. Ma anche in questo caso deve essere ricordato come solo negli ultimi anni un incremento

del livello di coscienza professionale ha portato un numero sempre maggiore di veterinari ippiatrì a richiedere la diagnosi istologica delle neoplasie asportate.

Le neoplasie giudicate *rare* sono infatti afferite al nostro Istituto uniformemente nel corso del periodo considerato, mentre le neoplasie ritenute *comuni* sono state raccolte soprattutto negli ultimi anni. Se la stessa indagine fosse stata effettuata nel 1980, sarebbe risultato che in 45 anni su 1185 cavalli esaminati si erano verificati solo tre casi di sarcoide!

Già nel 1977 Cotchin rilevava infatti una sostanziale carenza di dati epidemiologici attendibili sulle neoplasie equine, sebbene obiettivamente interessanti e ben studiate dal punto di vista della descrizione dei singoli casi. A distanza di quasi 20 anni la situazione non è cambiata di molto, se si eccettuano alcuni recenti studi sull'epidemiologia del sarcoide (Mohammed et al., 1992; Reid et al., 1994) e del carcinoma squamocellulare (Dugan et al., 1991).

In conclusione, vogliamo sottolineare la nostra convinzione che, in analogia a quanto attuato per l'uomo, il cane ed il gatto con l'istituzione a livello nazionale ed internazionale di registri tumori, sarebbe di grande interesse scientifico e pratico avviare anche per il cavallo un sistema permanente di sorveglianza oncologica.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Baker J.R., Ellis C.E. (1981): *A survey of post-mortem findings in 480 horses 1958 to 1980:(1) causes of death*. Equine Vet. J., 13, 43.
- 2) Baker J.R., Leyland A. (1975): *Histological survey of tumours of the horse, with particular reference to those of the skin*. Vet. Rec., 96, 419.
- 3) Baptista R., Silva M.C. (1985): *Blastomas dos animais: dados estatísticos*. Rep. Trab. Lab. Nac. Inv. Vet., 17, 95.
- 4) Bastianello S.S. (1983): *A survey on neoplasia in domestic species over a period from 1935 to 1974 in the Republic of South Africa*. Onderstepoort J. Vet. Res., 50, 91.
- 5) Bettini G. (1991): *La patologia dell'apparato urinario nel cavallo*. Ippologia, 2, 65.
- 6) Brandly P.J., Migaki G. (1963): *Types of tumors found by Federal meat inspectors in an eight-year survey*. Ann. N.Y. Academy Sciences, 108, 872.
- 7) Cotchin E. (1960): *Tumors of farm animals*. Vet. Rec., 72, 816.
- 8) Cotchin E. (1977): *A general survey of tumours in the horse*. Equine Vet. J., 9, 16.
- 9) Cotchin E., Baker-Smith J. (1975): *Correspondence: Tumours in horses encountered in an abattoir survey*. Vet. Rec., 97, 339.
- 10) Damodaran S., Ramachandran P.V. (1986): *A survey of neoplasms of equidae*. Centaur., 2, 161.

- 11) Della Salda L., Marcato P.S. (1990): *17 casi di linfosarcoma equino classificati secondo la "National Cancer Institute Working Formulation"*. Arch. Vet. Ital., 41, 93 .
- 12) Di Domizio G. (1948): *Un gruppo di tumori renali maligni degli animali domestici*. Atti S.I.S. Vet., 2, 441.
- 13) Dugan S.J., Curtis C.R., Roberts S.M., Severin G.A. (1991): *Epidemiologic study of ocular/adnexal squamous cell carcinoma in horses*. JAVMA, 198, 251.
- 14) Haghdoost I.S., Zakarian B. (1985): *Neoplasms of equidae in Iran*. Equine Vet. J., 17, 237.
- 15) Junge R.E., Sundberg J.P., Lancaster W.D. (1984): *Papillomas and squamous cell carcinomas of horses*. JAVMA, 185, 656.
- 16) Kerr K.M., Alden C. (1975): *Equine neoplasia - A ten year survey*. Proceedings 17th Ann. Mect. Am. Ass. Vet. Lab. Diagn., 183.
- 17) Krüger G. (1975): *Ein Beitrag zur Tumorrhäufigkeit bei Haustieren*. 2 Mitteilung. Tierärztliche Umschau, 30, 79.
- 18) Krüger G. (1979): *Ein Beitrag zur Tumorrhäufigkeit bei Haustieren*. 3 Mitteilung. Tierärztliche Umschau, 34, 771.
- 19) Lis H. (1993): *Results of veterinary inspection of slaughtered horses in Poland with reference of neoplasms*. Medycyna Weterynaryjna, 49, 128.
- 20) Mair T.S., Brown P.J. (1993): *Clinical and pathological features of thoracic neoplasia in the horse*. Equine Vet. J., 25, 220.
- 21) Misdorp W. (1967): *Tumours in large domestic animals in the Netherlands*. J. Comp. Path., 77, 211.
- 22) Mohammed H.O., Rebhun W.C., Antczak D.F. (1992): *Factors associated with the risk of developing sarcoid tumours in horses*. Equine Vet. J., 24, 165.
- 23) Monsein D.L. (1991): *An overview of animal cancer registries in the United States and suggestions for improved applications*. Comp. Cont. Ed. Pract. Vet., 13, 1139.
- 24) Mullowney P.C. (1985): *Dermatologic diseases of horses - Part IV - Environmental, congenital and neoplastic disease*. Comp. Cont. Educ. Vet. Pract., 7, 22.
- 25) Nobel T.A., Koepfer U., Perl S., Nyska A. (1979): *Neoplasms of domestic mammals in Israel 1969-1979*. Refuah Veterinarith, 36, 23.
- 26) Nunes Petisca J.L. (1957): *Contributo allo studio dei tumori primitivi del fegato nei mammiferi domestici*. Veterinaria, 6, 140.
- 27) Panndorf H. (1970): *Statistischer Beitrag zum Geschwulstvorkommen im Patientengut einer Grosstierklinik*. Mh. Vet. Med., 25, 99.
- 28) Pascoe R.R., Summers P.M. (1981): *Clinical survey of tumours and tumour-like lesions in horses in south-east Queensland*. Equine Vet. J., 13, 235.
- 29) Plummer P.J.G. (1956): *A survey of 636 tumours from domesticated animals*. Can. J. Comp. Med., 20, 239.
- 30) Priester W.A., Mantel N. (1971): *Occurence of tumors in domestic animals. Data from 12 United States and Canadian colleges of veterinary medicine*. J. National Cancer Institute, 47, 1333.
- 31) Priester W.A., McKay F.W. (1980): *The occurrence of neoplasms in domestic animals*. National Cancer Institute Monograph 54, U. S. Dept. of health and human services, Bethesda.

- 32) Ramakrishnan R., Manohar B.M. (1980): *Melanoma in domestic animals - a survey*. Indian Vet. J., 57, 619.
- 33) Reid S.W., Gettinby G., Fowler J.N., Ikin P. (1994): *Epidemiological observations on sarcoids in a population of donkeys (Equus asinus)*. Vet. Rec., 134, 207.
- 34) Ru G. (1994): *Funzionamento e ruolo dei registri tumori*. Il Progresso Veterinario, 14, 454.
- 35) Singh P., Singh K., Sharma D.K., Behl S.M., Chandra I.S. (1991): *A survey of tumors in domestic animals*. Indian Vet. J., 68, 721.
- 36) Smith H.A., Jones T.C. (1957): *Veterinary Pathology*. Kempton, London, pagg. 223-233.
- 37) Sundberg J.P., Burnstein T., Page E.H., Kirkham W.W., Robinson F.R. (1977): *Neoplasms of equidae*. JAVMA, 170,150.
- 38) Sweeney C.R., Gillette D.M. (1989): *Thoracic neoplasia in equids: 35 cases (1967-1987)*. JAVMA, 195, 374.
- 39) Uberreiter O. (1960): *Neubildungen bei Tieren*. Wien Tierarztl. Mschr., 47, 805.
- 40) World Health Organization (1974): *International histological classification of tumours of domestic animals - Part 1*. Bull. WHO, 50, 1.
- 41) World Health Organization (1976): *International histological classification of tumours of domestic animals - Part 2*. Bull. WHO, 53, 137.
- 42) Zanichelli S., Pezzoli G., Del Buc M., Botti P., Scrollavezza P. (1994): *Observations on squamous cell carcinoma in the horse*. Pferdcheilkunde, 10, 219.

# CONTRIBUTO ALLO STUDIO DELLE ABIOTROFIE DEL CAVALLO

CORRADI A., CANTONI A.M., DI LECCE R.,  
PERILLO A., CABASSI E.

*Istituto di Anatomia Patologica Veterinaria, Parma*

## INTRODUZIONE

Le abiotrofie sono malattie neurodegenerative a carattere progressivo ad eziologia endogena, legate a difetti congeniti del metabolismo e/o dello sviluppo cellulare che provocano, con lenta progressione ipotrofia o atrofia simmetrica o bilaterale di un sistema.

In campo medico veterinario sono descritte e conosciute soprattutto nel cane (6, 7, 8) e nei ruminanti (13, 16, 21) mentre meno frequenti sono nelle specie equina e felina (9, 20). Si possono classificare essenzialmente in quattro gruppi come proposto da de Lahunta (9) e specificamente in: 1) degenerazioni del motoneurone; 2) degenerazioni multisistemiche; 3) degenerazioni cerebellari; 4) degenerazioni composite (astrociti, cellule di schwann, gangli spinali, assoni distali). Le degenerazioni multistemiche sono ulteriormente suddivise in forme che interessano specificamente: a) neurone; b) processi neuronali, coinvolgenti sia l'assone che la mielina; c) mielina; d) neuroassone; e) neurofilamenti.

Nella specie equina sono descritti casi di degenerazione multisistemica dei processi neuronali e neuroassonali rispettivamente nelle razze Appaloosa (17) e Morgan (1) e casi di degenerazione cerebellare nelle razze Araba e suoi incroci (4,5,18) nel Gotland pony (2) e nell'Oldenburger (4,15).

Nel presente lavoro verranno presentati tre casi di abiotrofia nell'equino, di cui due in forma cerebellare ed uno in forma multisistemica dei processi neuronali (spinocerebellare) che sono stati studiati e descritti nell'Istituto (3,10,11).

## ABIOTROFIA CEREBELLARE

### *Quadro clinico*

Le indagini sono state condotte su due puledri di razza Quarter horse, un maschio di 8 mesi ed una femmina di 16 mesi d'età della stessa scuderia e della stessa genia paterna. Gli animali, fin dal primo mese di vita, hanno presentato sintomi di atassia locomotoria progressiva non legata ad eventi traumatici o neurotossici (11). La visita neurologica ha permesso di formulare una diagnosi in sede di lesione a livello cerebellare e/o al midollo spinale cervicale. L'esame radiologico intra-vitam, con mezzo di contrasto, e post-mortem a nudo sul rachide cervicale ha permesso di escludere una patologia spinale Wobbler statica e/o funzionale ed ha consentito di rilevare una normale conformazione cerebellare (11). Gli accertamenti batteriologici, biochimici, citologici e sierologici hanno escluso inoltre una eventuale eziologia di origine microbiologica, neoplastica o metabolica (11).

## ABIOTROFIA SPINO-CEREBELLARE

### *Quadro clinico*

Lo studio è stato condotto su un puledro meticcio, femmina di 18 mesi d'età che ha mostrato segni di atassia. L'animale è nato in un allevamento della Sardegna in cui erano stati introdotti numerosi cavalli di diversa provenienza poco prima del parto; quasi contemporaneamente a questa introduzione è stata osservata la comparsa di una patologia respiratoria in tutti gli animali. (10). Il quadro di atassia è stato rilevato in più puledri e detta alterazione neurologica si è ripresentata nei 3 anni successivi terminando dopo intervento immunoprofilattico contro EHV.

L'esame dell'andatura in linea retta sul piano ed al passo ha permesso di appurare che il puledro procedeva con qualche limitazione dell'ampiezza e dell'energia dei movimenti degli arti. I movimenti, infatti, apparivano incerti, con andatura saltellante ed irrigidimento degli arti durante l'appoggio e diminuzione dell'ampiezza del passo e della levata del piede.

La prova di Romberg (bendaggio degli occhi) aggravava i disturbi dell'andatura e provocava allargamento della base di appoggio dell'animale in stazione.

Nel movimento in circolo stretto, l'incoordinazione degli arti appariva aumentata, anche se non provocava la caduta del soggetto. In queste prove, in particolare l'arto pelvico esterno al cerchio veniva iperflesso ed iperabdotto durante la propulsione, mentre quello interno appariva più lento

e tendente a fare da perno sul terreno e ad incespicare con il controlaterale protratto. Gli arti anteriori tendevano ad incrociarsi.

L'esecuzione del test di oscillazione era da considerarsi positivo, poichè la resistenza a tale manualità appariva notevolmente diminuita, con eccessiva oscillazione del tronco ed incrociamiento degli arti. Anche pressioni esercitate manualmente sul garrese e sul dorso provocavano eccessivi abbassamenti del tronco o cadute.

Se lasciato libero di correre nei recinti, il puledro manifestava un marcato aumento dell'atassia e della paresi durante i cambiamenti di direzione rispetto al deficit locomotorio in linea retta.

L'esame oftalmologico non ha evidenziato lesioni o disfunzioni oculari.

In sede autoptica sono stati prelevati frammenti di bulbo olfattivo e del ganglio del trigemino per indagini di isolamento virale con esito negativo, mentre test di sieroneutralizzazione per EHV1 (Equine Herpesvirus 1 - ceppo Army) e EAV (Equine Arteritis Virus) hanno mostrato titoli sieroneutralizzanti piuttosto bassi e per EHV1 mai superiori a 1/32 (10).

### *ESAME NECROSCOPICO*

Gli animali sono stati sacrificati mediante iniezione endovenosa di 30 ml di Tanax e successivamente sottoposti ad indagine necroscopica ed istopatologica. All'esame autoptico, in tutti i puledri, non sono state rilevate alterazioni a carico di organi, apparati e sistemi contenuti nelle grandi cavità splanchniche. L'esame anatomopatologico del S.N.C. non ha evidenziato alterazioni morfostrutturali al cervello, al cervelletto nonchè al midollo spinale. Il midollo spinale cervicale si è presentato allogato nello speco vertebrale in corretto rapporto anatomico con la pachimeninge ed il canale vertebrale (10, 11).

Sono stati effettuati prelievi del S.N.C e S.N.P. e dei gangli del trigemino per indagini istologiche, previa fissazione in formalina al 10% a pH 7.4, e inclusione in paraffina. Sono poi state approntate sezioni di 5  $\mu$  di spessore colorate secondo le tecniche routinarie per il sistema nervoso (10, 11).

### *ISTOPATOLOGIA*

#### *Abiotrofia cerebellare*

L'esame istologico del cervello, del midollo spinale cervicale, dei gangli paravertebrali e del ganglio del trigemino, non ha permesso di rilevare alterazioni morfostrutturali a carico di tali distretti anatomici. A livello

cerebellare si è osservata ipotrofia delle folia cerebellari, persistenza di numerosi nidi cellulari dello strato granulare esterno, diminuzione numerica delle cellule di Purkinje e dello strato granulare interno. In entrambi gli animali la diminuzione delle cellule del Purkinje ha interessato lunghi tratti di corteccia, spesso in modo non uniforme ed in loro corrispondenza si è rilevata ipoplasia dello strato granulare interno.

### *Abiotrofia spino-cerebellare*

#### *Midollo spinale*

a) *Bianco spinale*: nei cordoni bianchi spinali sono state rilevate lesioni simmetriche di degenerazione mielinica in corrispondenza dei transiti dei fasci spino-cerebellari dorsali (o di *Flechsing*), dei fasci piramidali crociati ed in minor misura dei fasci piramidali diretti e del gracile (o di *Goll*). In particolar modo sono risultati maggiormente colpiti dalla degenerazione, con fenomeni d'ipotrofia, le porzioni metameriche spinali mediotoraciche (T5-T12) dei fasci di *Flechsing*. Associati alla lesione degenerativa della mielina sono stati rilevati quadri di astrogliosi più o meno pronunciati. Di notevole rilievo è apparsa la presenza di neuroni fra gli assoni lungo l'intero decorso dei fasci spinocerebellari dorsali;

b) *Grigio spinale*: di rilievo è apparso il notevole spopolamento neuronale, simmetrico, delle colonne di *Clarke*, in cui erano pure rilevabili quadri di astrogliosi e d'accumulo di materiale metacromatico, lipofusina, nei neuroni ancora presenti;

c) *Radici dei nervi spinali*: si è registrato pallore mielinico delle radici spinali dorsali con andamento corrispondente alla mielinolisi dei fasci di *Flechsing* dei metameri medio toracici;

d) *Gangli spinali*: le strutture ganglionari sono apparse popolate da elementi cellulari rigonfi talvolta contenenti materiale finemente granuloso riferibile a lipofusina.

#### *Tronco cerebrale*

I nuclei di *Goll* hanno presentato modesti quadri di spopolamento neuronale ed astrogliosi.

#### *Centri sovrasiali centrali*

a) *Cervelletto*: a livello delle folia cerebellari del paleocerebellum si è osservata la presenza di piccoli nidi cellulari, sottoleptomeningei, popolati da elementi persistenti dello strato granulare esterno embrionale. Continuando

nelle folia cerebellari, in corrispondenza di tali nidi di persistenza d'elementi cellulari embrionali, si è rilevata una lieve riduzione numerica di cellule del *Purkinje* e dello strato dei granuli interno. A livello di nucleo dentato si è rilevata una diminuzione delle cellule, per morte neuronale, contemporaneamente alla presenza di neuroni con alterazioni morfofunzionali riferibili a tigrolisi.

b) *Encefalo*: sono state osservate degenerazioni mieliniche a livello delle porzioni più laterali del braccio posteriore della capsula interna e quadri regressivi neuronali nella corteccia motoria.

#### *Ganglio di Gasser*

Gli elementi ganglionari sono apparsi in numero normale e normostrutturati.

#### *S.N.P.*

L'esame dei nervi ha permesso di rilevare una corretta mielinizzazione e disposizione degli assoni.

### *DISCUSSIONE*

#### *Abiotrofia cerebellare*

Sulla base dei rilievi clinici e radiologici, è stata esclusa la sindrome Wobbler e, dalle indagini di laboratorio sui liquidi organici di entrambi i puledri, anche la presenza di anticorpi contro l'EHV-1 e di batteri. In letteratura, i casi di abiotrofia cerebellare in cavalli di razza Araba e loro incroci, sono descritti come quadri neuropatologici con diminuzione numerica dei neuroni e mineralizzazione neuronale in sede talamica (4,5,18). E' evidente che i quadri anatomopatologici cerebellari da noi osservati nei due puledri Quarter horse differiscono sostanzialmente da quelli descritti nei cavalli di razza Araba, soprattutto per la persistenza di cellule nello strato granulare cerebellare esterno. E' noto che nell'ontogenesi del S.N.C. si riconoscono tre fasi distinte e fondamentali. La prima fase prevede la proliferazione delle cellule germinali, la loro differenziazione e la successiva migrazione nelle sedi definitive. La seconda fase, caratterizzata dalla formazione degli assoni e dei dendriti, è influenzata da fattori di crescita quale il "nerve growth factor", che controlla la sopravvivenza e la crescita dei neuroni, nonché il loro sviluppo assono-dendritico. Nella terza fase si assiste alla sinaptogenesi. Anche nel cervelletto queste tre fasi si riconoscono perfettamente; iniziano

nell'ultimo terzo della vita fetale dell'animale con la migrazione delle cellule germinali paraventricolari (IV ventricolo) in sedi anatomiche intermedie (strato esterno delle folia cerebellari), in cui esse proliferano; si differenziano in microneuroni e poi migrano nelle sedi anatomiche definitive. Successivamente iniziano le fasi dell'assonodendrogenesi e della sinaptogenesi che si esauriscono nelle prime settimane di vita post-natale. La diminuzione numerica dei neuroni del Purkinje e dei microneuroni dello strato dei granuli ha impedito lo sviluppo degli stessi in un preordinato disegno genetico assonale, teledendritico e successivamente sinaptico. La mancata o la scarsa stimolazione elettrica di un neurone, causata da un ridotto numero di contatti sinaptici sul perikarion, lo porta a morte ed innesca una reazione neurodegenerativa retrograda a catena, dimostrando che l'ontogenesi cerebellare incompleta non è un fenomeno neuropatologico statico, ma evolve e progredisce internamente al sistema.

Nel cervelletto dei puledri da noi esaminati è stata riscontrata la persistenza di cellule germinali nello strato granulare esterno; ciò dimostra che le cellule germinali hanno migrato correttamente dalla loro sede originale paraventricolare alla sede intermedia (strato esterno delle folia cerebellari); parte di esse, però, non hanno completato la colonizzazione nelle sedi anatomiche definitive (strato delle cellule del Purkinje e strato dei granuli).

La causa è verosimilmente correlabile ad una mancata differenziazione delle cellule dello strato granulare esterno in microneuroni, per una probabile carenza genetica di qualche fattore di crescita non ancora conosciuto, che ne ha impedito la migrazione e le successive fasi evolutive.

L'eredofamiliarità dell'atassia cerebellare è stata presupposta nel cavallo di razza Araba e suoi incroci (4,5,18), nell'Oldenburger (15) e nei pony Gotland (2), dimostrata nei cani di razza Kerry Blue Terrier (6,7), nel Setter Gordon (8) e nel Collie (14), nel bovino di razza Aberdeen Angus (12) e nell'ovino (13, 16).

I nostri risultati, in rapporto alla riconosciuta paternità comune dei due puledri e dai rilievi anamnestici e clinici raccolti, che hanno escluso l'intervento di "noxae" esogene, lasciano, quindi, presupporre un'eziologia eredofamiliare da carenza di fattori ontogenetici.

#### *Abiotrofia spino-cerebellare*

Dai quadri anatomo-clinici è possibile identificare il quadro nosologico principalmente come una atassia spino-cerebellare, su base non infettiva che ha coinvolto in modo lieve ed indiretto anche sistemi motori piramidali. Il

quadro clinico è caratterizzato da disfunzioni propriocettive e motorie, soprattutto del tronco e degli arti posteriori. Gli impulsi propriocettivi del tronco e degli arti non possono raggiungere il paleocerebello e tantomeno essere elaborati in questa sede e riproiettati in risposta ai muscoli specifici, causa la presenza di alterazioni specifiche del midollo spinale e del cervelletto. Le alterazioni del mielencefalo sono state registrate a carico sia dei sistemi grigi spinali afferenti (morte dei neuroni e del nucleo di *Clarke*) che a carico delle vie bianche spinali adibite al trasporto di tali impulsi nervosi ai territori paleocerebellari (degenerazione dei fasci spino-cerebellari dorsali). Le alterazioni cerebellari sono risultate a carico dei nuclei cerebellari e delle lamine del lobo paleocerebellare che rispettivamente si sono manifestate con diminuzione numerica dei neuroni del nucleo dentato e persistenza, a livello di lamine paleocerebellari, d'elementi dello strato granulare esterno d'origine embrionale, chiara espressione di abiotrofia cerebellare da noi già documentata (3, 11). Nel paleocerebello si concretizzano soprattutto funzioni di controllo del tono di posizione dei muscoli striati, ma anche funzioni di mantenimento del tono muscolare necessario per l'equilibrio dell'animale tramite le vie vestibolo-spinali ai motoneuroni dei muscoli estensori, via rubro-spinale ai motoneuroni dei muscoli flessori omolaterali; nonchè all'organizzazione e modulazione del movimento di interi gruppi muscolari attraverso la via cerebello (nucleo dentato) - talamo - corticale. Dette lesioni cerebellari hanno poi coinvolto secondariamente il telencefalo, per mancata relazione neuroelettrochimica tra cervelletto e regioni cerebrocorticali tramite la via cerebello (nucleo dentato) - talamo - corticale, pertanto le disfunzioni motorie oltre riconoscere la loro primitiva origine nel paleocerebello, sono pure da attribuire ad alterazioni telencefaliche. Infatti sono state rilevate lesioni nella corteccia cortico motoria e nel braccio posteriore della capsula interna, sede di transito delle vie piramidali.

Dall'analisi completa del complesso quadro di questa atassia, riteniamo che un ruolo determinante nella sua patogenesi sia stato giocato dall'alterata neurobiotassi dei neuroni spinali e cerebellari. La mancata migrazione di questi neuroni dalle loro sedi embrionali alle sedi definitive nel midollo spinale (colonna grigia di *Clarke*) e nel cervelletto (strato delle cellule del *Purkinje* e strato granulare interno) ha impedito il loro sviluppo in un preordinato disegno genetico assonale, teledendritico e successivamente sinaptico. E' risaputo che la mancata o la ridotta stimolazione elettrochimica di un neurone lo porta a morte e che la sua morte inizia una reazione degenerativa retrograda a catena che progredisce ed evolve all'interno di un

sistema, che nel nostro caso specifico è quello spino-cerebellare.

La causa, purtroppo, non è identificabile con certezza, ma è possibile ipotizzarne alcune:

a) carenza di fattori del differenziamento cellulare come ad esempio il *Nerve Growth Factor* od altri;

b) anomalie dell'attività di enzimi mitocondriali come la piruvatodeidrogenasi e l'ossiglutarato deidrogenasi, come ipotizzato per l'ataxia di Friederich;

c) meno probabile e di più difficile dimostrazione, comunque da tenere in seria considerazione, è l'ipotetica azione di virus sul DNA cellulare, che possa aver provocato o una diminuzione o una alterazione della sintesi di proteine, di mediatori neuro biochimici, ecc.

### CONCLUSIONI

In conclusione possiamo affermare che le patologie descritte sono malattie neurodegenerative cerebellari e del sistema spino cerebellare ed hanno carattere abiotrofico in quanto soddisfano tutti i postulati di *Spatz* (19), ossia: 1) atrofia o ipotrofia del cervelletto e dei fasci spinocerebellari dorsali); 2) lento progredire; 3) appartenenza ad un sistema (cervelletto e sistema spino-cerebellare); 4) simmetria o bilateralità della lesione ( cervelletto e fasci spino-cerebellari dorsali, fasci piramidali, fascio di Goll); 5) presenza di un'eziologia endogena (alterata neurobiotassi dei neuroni dello strato granulare esterno nell'abiotrofia cerebellare ed alterata neurobiotassi dei neuroni dello strato granulare esterno cerebellare e dei neuroni spinali nell'abiotrofia spinocerebellare).

### BIBLIOGRAFIA

- 1) Bicch J. (1984) *Neuroaxonal dystrophy of the accessory cuneate nucleus in horse*. Vet. Pathol., 21,384-393.
- 2) Bjork G., Everz K.E., Hansen H.J., Henriksen B. (1973) *Congenital cerebellar ataxia in the Gotland pony breed*. Zbl. Vet. Med. Ass., 20,341-354.
- 3) Corradi A., Di Lecce R., Gnudi G., Cacchioli A., Gianelli P. (1992) *Cerebellar abiotrophic ataxia in two quarter horse: pathological findings*. Proc. Eur. Soc. Vet. Pathol., Med. Vet., 9,9,120.
- 4) De Bowes R.M., Leipold H.W., Turner-Beatty M. (1987) *Cerebellar abiotrophy*. Vet. Clin. North Am. (Equine practice), 3,345.
- 5) De Bowes R.M., Gift L. (1992) *Common malformation and congenital abnormalities of the Central Nervous System*. In Robinson N.E. edition: *Current therapy in Equine Medicine* 3. Philadelphia, W.B. Saunders, 530-535.

- 6) De Forest M.E., Eger C.E., Basbur P.K. (1978) *Hereditary cerebellar neuronal abiotrophy in a Kerry blue terrier dog*. Can. Vet. Jour., 19, 198-202.
- 7) de Lahunta A., Averill D.R. (1976) *Hereditary cerebellar cortical and extrapyramidal nuclear abiotrophy in Kerry blue terriers*. Jour. Am. Vet. Med. Ass., 168, 1119-1124.
- 8) de Lahunta A., Fenner W.R., Indrici R.J., Mellick P.W., Gardner S., Bell J.S. (1980) *Hereditary cerebellar cortical abiotrophy in the Gordon setter*. Jour. Am. Vet. Med. Ass., 177, 538-541.
- 9) de Lahunta (1990) *Abiotrophy in domestic animals: a review*. Can. J. Vet. Res. 54, 65-76.
- 10) Dondi M., Corradi A., Cavarani S., Garau D., Cantoni A.M., Kramer L., Crafa P., Zannetti G. (1994) *A case of equine enzootic spino-cerebellar abiotrophic disease*. Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria di Parma, vol. XIV, in stampa.
- 11) Gnudi G. Corradi A., Bertoni G., Cantoni A.M., Cabassi E. (1993) *Atassia da abiotrofia cerebellare in Puledri di razza Quarter horse: aspetti clinici ed anatomopatologici*. Atti XI Congresso Nazionale della Società Italiana di Ippologia, Bergamo 19-21 maggio 1993, 159-170.
- 12) Gould D.H., Lecouteur R.A., Bertone J.J., Knight A.P. (1985) *Cerebellar cortical atrophy in Angus calves*. Proc. Am. Coll. Vet. Pathol., 239.
- 13) Harper P., Duncan D.W., Plant J.W., Smcal M.J. (1986) *Cerebellar abiotrophy and segmental axonopathy (two syndromes of progressive ataxia of merino sheep)*. Aus. Vet. Jour., 63, 18-21.
- 14) Hartley W.J., Burker J.S.F., Wanner R.A., Farrow B.R.H. (1978) *Inherited cerebellar degeneration in the Rough Coated Collie*. Aus. Vet. Jour., 8, 1-7.
- 15) Koch P., Fischer H. (1950) *Die Oldenburger fohlenataxie als erbkrankheit Tieraerzt. Umsch.*, 5, 317-320.
- 16) Innes J.R.M., Rowlands W.T., Parry H.B. (1949) *An inherited form of cortical cerebellar atrophy in ("daft") lambs in Great Britain*. Vet. Rec., 61, 225-228.
- 17) Mayhew I.G., De Lahunta A., Withlock R.H., Geary J.C. (1977) *Equine degenerative mieloencephalopathy*. Jour. Am. Vet. Med. Ass., 170, 195-201.
- 18) Palmer A.C., Blakemore W.F., Cook W.R., Platt H., Whitewell K.E. (1973) *Cerebellar hypoplasia and degeneration in the young Arab horse: clinical and neuropathological features*. Vet. Rec., 93, 62-66.
- 19) Raso M. (1986) *Abiotrofia eredo-familiare*. In Anatomia Patologica Clinica, Piccin ed., Padova, 3, 459-457.
- 20) Schut J.W. (1946) *Olivopontocerebellar atrophy in a cat*. Jour. Neuropathol. Exp. Neurol., 5, 77-81.
- 21) White M., Whitlock R.H., De Lahunta A. (1975) *A cerebellar abiotrophy of calves*. Cornell Vet., 65, 476-491.

# **METODICA DI DOSAGGIO DEI GLICOSAMINOGLICANI SOLFATI NEL LIQUIDO SINOVIALE DI CAVALLO: PROSPETTIVE PER LO STUDIO DELLA PATOLO- GIA DELLA CARTILAGINE ARTICOLARE**

BORGHETTI P. (\*), MARTINI F.M. (\*\*), DE ANGELIS E. (\*)

(\*) *Ist. Anatomia Patologica Veterinaria, Parma*

(\*\*) *Ist. Clinica Chirurgica Veterinaria, Parma*

## **RIASSUNTO**

Gli Autori hanno analizzato la sensibilità e la riproducibilità del dosaggio colorimetrico dei glicosaminoglicani solfati totali (GAGs) e del cheratansolfato (KS) nel liquido sinoviale ottenuto dalle articolazioni metacarpo-falangee di 45 cavalli. E' risultato che nè la refrigerazione per 24 ore nè il congelamento del liquido sinoviale influiscono sul dosaggio rispetto al campione a fresco. Inoltre sono state determinate le diluizioni e i trattamenti enzimatici del campione opportuni per l'attendibilità della metodica. I valori ottenuti sono stati poi analizzati in base alla presenza e al tipo delle lesioni della cartilagine articolare riscontrate all'esame anatomopatologico. I campioni di liquido sinoviale ottenuti da articolazioni con lesioni degenerative macroscopiche della cartilagine, hanno presentato livelli di GAGs totali ( $255,6 + 125 \mu\text{g/ml}$ ) e di KS ( $95,3$  i  $74,1 \mu\text{g/ml}$ ) significativamente più elevati ( $P < 0,01$ ) di quelli del liquido sinoviale di articolazioni non patologiche (GAGs:  $76,8 \pm 24,2 \mu\text{g/ml}$ ; KS:  $33 \pm 13,3 \mu\text{g/ml}$ ).

**SUMMARY:** The Authors analyzed the sensitivity of colorimetric assay of total glycosaminoglycans sulphate and keratan sulphate in synovial fluid obtained from metacarpophalangeal joints of 45 horses. Both cooling for 24 hours and freezing of synovial fluid sample didn't influence the results of the measurement. Suitable dilutions and enzymatic treatments of the sample were also determined to assess the accuracy of the assay. The data were then analyzed in relation to the presence and type of macroscopic lesions of the

articular cartilage. Synovial fluids from joints with lesions showed levels of GAGs ( $255,6 \pm 125 \mu\text{g/ml}$ ) and of KS ( $95,3 \pm 74,1 \mu\text{g/ml}$ ) significantly higher ( $P < 0,01$ ) than normal joints (GAGs:  $76,8 \pm 24,2 \mu\text{g/ml}$ ; KS:  $33 \pm 13,3 \mu\text{g/ml}$ ).

## INTRODUZIONE

Data l'importanza della patologia articolare nel cavallo sportivo, attualmente si stanno studiando nuovi metodi di indagine che permettano di valutare la gravità e l'evoluzione del processo degenerativo del tessuto cartilagineo articolare. Tali metodi si basano sul fatto che la cartilagine, in corso di osteoartrite, a causa dell'alterato metabolismo tissutale, rilascia nel liquido sinoviale diverse molecole o frammenti molecolari che, essendo espressione diretta del danno, possono fungere da indicatori del processo degenerativo e degradativo della cartilagine. In quest'ottica, i glicosaminoglicani solfati rappresentano le molecole di derivazione cartilaginea attualmente più studiate soprattutto in medicina umana (3,5,6,7). In questo lavoro, considerata la limitata esperienza in campo equino (1), si è voluto analizzare la applicabilità e l'attendibilità del dosaggio colorimetrico dei glicosaminoglicani solfati totali (GAGs) e del cheratansolfato (KS) nel liquido sinoviale di cavallo e valutare tali valori in base al tipo ed alla gravità delle lesioni cartilaginee riscontrate all'esame anatomopatologico.

## MATERIALI E METODI

*Esame del liquido sinoviale* Il liquido sinoviale è stato prelevato da entrambe le articolazioni metacarpo-falangee di 45 cavalli di varie razze prevalentemente da lavoro e di età compresa tra 1 e 25 anni. Appena dopo il prelievo, i campioni di liquido sinoviale (L.S.) sono stati valutati macroscopicamente in base al volume totale, colore, viscosità e presenza di sangue. I campioni sono stati poi centrifugati a 2000 rpm per 10 minuti e successivamente il sovranatante è stato sottoposto ad una seconda centrifugazione a 10.000 rpm per 5 minuti. Il campione ottenuto è stato diluito e trattato con  $300 \mu\text{g/ml}$  di papaina per 2 ore a  $65^\circ\text{C}$ . Per il dosaggio del cheratansolfato il campione è stato sottoposto ad un secondo trattamento enzimatico con condroitinase ABC. Dopo i trattamenti enzimatici sopra descritti ai campioni è stato aggiunto DMMB (dimetilmetilene blu) e i valori di

GAGs e di KS sono stati misurati con spettrofotometro a 525 nm (4). I valori di densità ottica (D.O.) sono riportati a  $\mu\text{g/ml}$  in base alle rette degli standards (condroitinsolfato A da 0,5 a 6  $\mu\text{g}$  e cheratansolfato da 0,5 a 9  $\mu\text{g}$ ).

Alcune tappe metodologiche sono state opportunamente valutate ai fini dell'ottimizzazione della metodica descritta: - sono state analizzate differenti diluizioni del campione allo scopo di ottenere valori di D.O. che rientrino nelle rette di D.O. ottenute con valori crescenti degli standards utilizzati (condroitinsolfato A e cheratansolfato). - per il dosaggio del cheratansolfato si è valutato l'effetto di differenti concentrazioni di condroitinase ABC (da 0,1-0,5 U/ml) e tempi di incubazione a 37°C (da 4 ore a 12 ore) al fine di eliminare completamente l'interferenza dovuta ai condroitinsolfati. - sono stati determinati i valori dei GAGs sui sovrantanti dei campioni sia a fresco che dopo stoccaggio a - 80°C - si è inoltre valutato un eventuale effetto della refrigerazione del campione di liquido sinoviale in toto per 24 ore a 4° C prima della centrifugazione.

*Esame macroscopico delle articolazioni* Dopo la regolare macellazione, si è proceduto all'esame anatomopatologico delle articolazioni metacarpo-falangee da cui era stato prelevato il liquido sinoviale (in totale 90 articolazioni osservate) classificandole in base alla assenza [N = normale (n° 31 articolazioni)] o presenza [P = patologico (n° 59 articolazioni)] di lesioni:

- lesione puntiforme crateriforme
- erosione focale
- aree di assottigliamento
- aree di corrugamento e fibrillazione
- erosioni focali multiple
- fessurazioni lineari da sfregamento
- erosioni estese
- reazioni fibrocartilaginee
- osteofitosi marginali
- coinvolgimento capsulo-sinoviale

## **RISULTATI**

Dalle indagini effettuate, è risultato che l'eventuale presenza di strie di sangue nel campione, dovuta alle modalità di prelievo, è eliminata costantemente con la prima centrifugazione, mentre la presenza di emartro può esse-

re totalmente o parzialmente (in presenza di emolisi diffusa) eliminata con la seconda centrifugazione: in quest'ultimo caso l'attendibilità del dosaggio può essere relativa. Le diluizioni del campione più idonee per il dosaggio sono risultate 1/12,5-1/25 per i GAGs e 1/4-1/8 per il cheratansolfato. Per il dosaggio dei GAGs totali, tali diluizioni risultano importanti in quanto permettono di ottenere valori di D.O. che rientrano nella retta degli standards ottenuta con 1-6  $\mu\text{g}$  di condroitinsolfato in quanto con valori maggiori di 6 mg viene persa la linearità della risposta; tale problema è di minor entità per il KS la cui retta degli standards risulta lineare tra 1 e 9  $\mu\text{g}$  (Graf. 1). L'eliminazione completa dell'interferenza colorimetrica dei condroitinsolfati per la determinazione del KS è stata ottenuta con il trattamento del campione diluito con condroitinase 0,1 U/ml per 12 ore.

Lo stoccaggio a  $-80^{\circ}\text{C}$  non altera i valori di GAGs rispetto ai campioni trattati a fresco. Analogamente la refrigerazione del campione per 24 ore prima delle centrifugazioni non comporta significative differenze di dosaggio.

I campioni di liquido sinoviale ottenuti da articolazioni con lesioni degenerative macroscopiche della cartilagine, hanno presentato alti livelli di GAGs totali, con intervallo da 80 a 625  $\mu\text{g}/\text{ml}$  e una media (+ ds) di 255,6

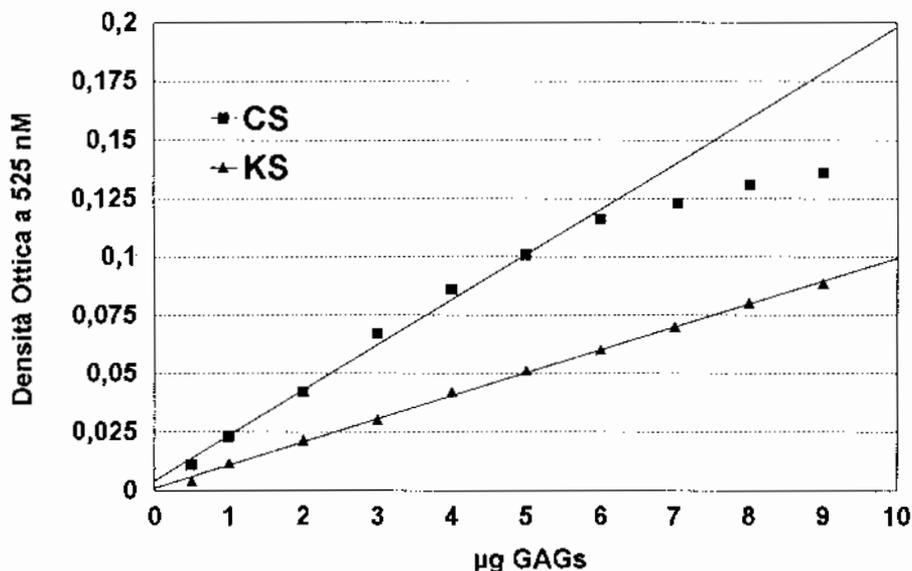


Grafico 1 - Rette degli standards.

( $\pm 125$ )  $\mu\text{g/ml}$  e di KS, da 15 a 223  $\mu\text{g/ml}$  con una media (+ ds) di 95,3 ( $\pm 74,1$ ). Tali valori sono risultati significativamente più elevati ( $P < 0,01$ ) di quelli del liquido sinoviale di articolazioni non patologiche (GAGs: 76,8 + 24,2  $\mu\text{g/ml}$ ; KS: 33 + 13,3  $\mu\text{g/ml}$ ).

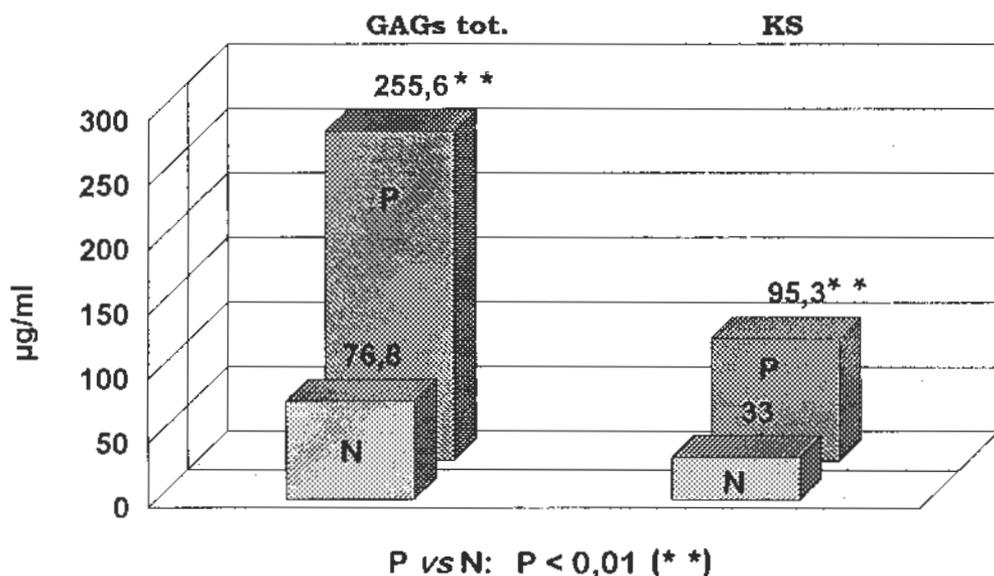


Grafico 2 - Dosaggio colorimetrico (DMMB).

## DISCUSSIONE

Con gli opportuni adattamenti, riguardanti soprattutto le centrifugazioni, diluizioni e trattamenti enzimatici, il dosaggio colorimetrico dei GAGs e del cheratansolfato è risultato una metodica di facile e rapida applicazione anche sul liquido sinoviale di cavallo con ripetibilità ed attendibilità dei risultati.

L'ininfluenza della refrigerazione del campione in toto per 24 ore prima del trattamento e del dosaggio concede un sufficiente margine nella gestione del campione prelevato in campo.

Vista la significativa differenza dei valori dei GAGs totali e del KS tra articolazioni patologiche e normali, ne risulta che tale determinazione può essere utilizzata anche nel cavallo per valutare l'entità del rilascio dei proteoglicani da parte del tessuto cartilagineo in corso di fenomeni degene-

rativi. L'ampio range di valori riscontrato nei campioni patologici porta però a considerare che l'utilità di tali metodiche nell'applicazione clinica, debba essere ulteriormente approfondita sulla base non solo della gravità ma soprattutto del momento evolutivo della lesione.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Alwan WH, Carter SD, Bennett D, Edwards GB (1991). *Glycosaminoglycans in horses with osteoarthritis*. Equine Vet J, 23 (1), 44-47.
- 2) Carroll GJ (1987). *Spectrophotometric measurement of proteoglycans in osteoarthritic synovial fluid*. Annals of the Rheumatic Diseases, 46, 375-379.
- 3) Carroll GJ, Mc Cappin S, Bell M, Schwarzer A, Breidahl P (1991). *Comparison of keratan sulphate concentration and the size distribution of proteoglycans in the synovial fluid of patients with osteoarthritis and pyrophosphate arthropaty*. Rheumatol Int, 11, 63-68.
- 4) Farndale RW, Buttle DJ, Barret AJ (1986). *Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue*. Biochim Biophys Acta, 883, 173-177.
- 5) Saxne T, Heinegard D, Wollheim FA. (1987) *Cartilage proteoglycans in synovial fluid and serum in patients with inflammatory joint disease*. Arthritis and Rheumatism, 9 (30), 972-979.
- 6) Sweet MBE, Coelho A, Schnikler CM, Schniker TJ, Lenz ME, Jakim I, Kuettnner KE, Thonar MA. (1988) *Serum keratan sulfate levels in osteoarthritis patients*. Arthritis and Rheumatism, 5 (31), 648-652.
- 7) Thonar EJM, Lenz ME, Klintworth GK, Caterson B, Pachman LM, Glickman P, Kak R, Huff J, Kuettnner KE. (1985) *Quantification of keratan sulfate in blood as a marker cartilage catabolism*. Arthritis and Rheumatism, 12 (28), 1367-1376.

# CONTRIBUTO ALLA CONOSCENZA DEI TUMORI PLACENTARI DEGLI EQUINI

CAMMARATA G. \*, SIRONI G. \*, RICCABONI P. \*, COMO D°.

\* Istituto di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviaria, Milano  
° Medico Veterinario

Si può affermare che negli animali i tumori placentari sono segnalati molto raramente, anche se è opportuno distinguere tra le neoplasie placentari sperimentalmente indotte e quelle spontanee.

Il coriocarcinoma è stato infatti indotto in diversi animali da laboratorio soprattutto allo scopo di approfondire le conoscenze sulle moli idatiformi ed invasive e sui coriocarcinomi della placenta umana che risultano verificarsi con una frequenza media stimata di un caso ogni 2000 gravidanze (Robbins *et al.* 1987) e che in alcuni casi invadono la parete uterina e danno luogo a metastasi nella madre (Hertig e Mansell, 1956). Così sono stati indotti coriocarcinomi mediante agenti chimici, dopo fetotomia, nel ratto e nella cavia (Riser *et al.*, 1959; Rocken e Bildbericht, 1973; Shintani *et al.*, 1966; Kumaro, 1979); mediante fetotomia ed inoculazione del virus del sarcoma di Moloney nel ratto (Symeonidis e Mori-Chavez, 1953); mediante distruzione del nucleo ipotalamico in coniglie gravide (Kushima *et al.*, 1967).

Tra i tumori placentari spontanei degli animali si possono annoverare alcuni casi di coriocarcinoma (di cui uno ovarico) nel topo (Alison *et al.*, 1987; Madarama *et al.*, 1989); uno (extragenitale) in un ratto maschio (Pirak *et al.*, 1991); uno nell'armadillo (Marin-Padilla e Benirschke, 1963); due nella scimmia Rhesus (*Macaca mulatta*) (Lindsey *et al.*, 1969; Paloty e Mc Nulty, 1972). Corioepiteliomi sono stati riportati anche nel cane (Schlotthauer, 1939; Riser, 1940) e nel bovino (Ball, 1932; Folger, 1934) ma secondo diversi ricercatori (Linsey *et al.*, 1969; Nielsen e Kennedy, 1990), essi non sarebbero documentati in modo adeguato o sufficientemente convincente. Nel bovino sono inoltre segnalati due casi di angioma della placenta o corioangioma (Karlson e Kelly, 1941; Kirkbride *et al.*, 1973). Una rassegna dei tumori placentari degli animali domestici è stata redatta da Drieux e Thiery (1948) che ne descrivono anche un caso nel gatto.

Più recentemente Gopal *et al.*, (1980) riferiscono di due moli idatiformi

osservate in bovine Holstein, una dopo la nascita di un vitello sano, la seconda dopo l'aborto di un feto con osteoporosi. Non risulta che le moli idatiformi del bovino siano capaci di manifestare potenzialità maligna: secondo l'opinione dei più, esse non sarebbero neppure dei veri tumori, ma piuttosto il risultato di modificazioni cistiche e degenerative di villi corionici (Theilen e Madewell, 1979; Nielsen e Kennedy, 1990) e, in base a un'ipotesi di Folger (1934) condivisa da Gopal *et al.* (1980), potrebbero derivare da porzioni di placenta rimaste impiantate in un tratto recettivo dell'endometrio dopo la morte di un feto gemello.

Negli equini sono note alterazioni placentari a carattere quasi esclusivamente iperplastico-displastico e solo occasionalmente è stata ventilata la possibilità di considerare simili lesioni alla stregua di neoplasie benigne (Elsinghorst, 1972). I casi di iperplasia allantoidea della placenta della cavalla noti finora sono poco più di 70 e sono in gran parte segnalati in epoca recente. Infatti, dopo due casi riferiti da Elsinghorst (1972) ed un caso descritto da Mc Entee *et al.*, (1988), pochi anni or sono Hong *et al.* (1993) ne hanno segnalati 63 su 954 placentate equine esaminate dal 1 Febbraio 1988 al 31 Gennaio 1990. Inoltre, pochi anni dopo, Shivaprasad *et al.* (1994) hanno descritto altri 8 casi di iperplasia adenomatosa cistica dell'allantoide equino.

Dalla casistica nota, l'iperplasia allantoidea risulta colpire placentate di cavalle senza particolare predisposizione di razza e di età. Dette placentate vengono espulse dopo aborti, generalmente tardivi, o dopo parti prematuri, con nati morti o sopravvissuti non più di una settimana. Non di rado le madri hanno fama di buone riproduttrici e si segnalano parti normali sia precedenti, che successivi alla gravidanza con iperplasia allantoidea. Frequentemente, ma non costantemente, la lesione risulta concomitante a fenomeni infiammatori, perlopiù cronici, della placenta stessa e delle vie genitali, sostenuti da agenti batterici o talvolta fungini. Nei feti o nei neonati i quadri necroscopici, quando non sono silenti, segnalano reperti occasionali e disuniformi come una polmonite batterica, una malformazione della testa, un tamponamento cardiaco, senza evidenza di un sicuro rapporto con l'iperplasia allantoidea.

Quest'ultima lesione, sempre strettamente limitata alla placenta, consiste in ispessimenti nodulari, nodosi ed a placca della parete dell'allantocorion, sporgenti sulla superficie interna del medesimo e situati spesso lungo il decorso dei vasi sanguiferi in prossimità dell'inserzione di vasi ombelicali. Le loro dimensioni variano da cm 0,5 x 0,5 per i noduli più piccoli, a cm 20 x 30 x 1 per le lesioni a placca più grandi. Le neoformazioni hanno superficie liscia, di colore bianco-giallastro a rosso-brunastro e possono presentare al

taglio cavità cistiche più o meno numerose od apparire omogeneamente polpose.

Istologicamente le alterazioni nodulari appaiono costituite da strutture acinari cistiche, delimitate da cellule cilindriche, cuboidali o talora appiattite. L'interno delle cavità ghiandolari può presentarsi vuoto o contenente un materiale amorfo, anfofilo, eventualmente misto a cellule desquamate ed a qualche neutrofilo. In alcuni casi l'epitelio cuboidale che riveste le cavità delle ghiandole iperplastiche, forma papille intraluminali (Shivaprasad *et al*, 1994) e talvolta le sue cellule si sovrappongono tra loro formando degli ammassi (Mc Entee *et al.*, 1988). Gli elementi dell'epitelio ghiandolare proliferante presentano citoplasma abbastanza ampio, contenente granulazioni eosinofile e vacuoli. I nuclei, vescicolari, tondi od ovali, hanno forma e dimensioni piuttosto uniformi. A differenza di quanto verificato nei tumori placentari di altri animali e dell'uomo, nell'iperplasia corioallantoidea del cavallo non sono stati notati elementi epiteliali sinciziali (sinciziotrofoblasti). Lo stroma allantoideo, talora scarso, talora abbondante, è costituito da un connettivo collageno, lasso, ben vascolarizzato, nel quale sono affondate le strutture ghiandolari, a volte contornate da un modesto infiltrato infiammatorio.

Il nostro caso riguarda una placenta equina espulsa, dopo l'aborto di un feto vivo, all'ottavo mese di gravidanza, da una cavalla che aveva alle spalle un'ottima carriera di riproduttrice. Le condizioni della madre dopo circa sei mesi dall'aborto permangono clinicamente normali.

L'allantoide presentava numerosissimi noduli, nodi e masse globose, prominenti sulla superficie interna, di diametro da 0,2 a 10 cm, di colore da giallo chiaro a rosso-bruno, di consistenza da soda a polposa-molle, con superficie di taglio da compatta a finemente porosa. Complessivamente la placenta così alterata superava di alcuni kg il peso di una placenta normale.

Alla necropsopia del feto si rilevavano, oltre a modici versamenti toracoaddominali siero-ematici, alcuni focolai epatici, bianco-giallastri, sferoidali, poco rilevati, del diametro variabile da 1 a 5 mm, ben delimitati dal circostante parenchima, ma non capsulati.

Istologicamente i nodi allantoidei risultavano costituiti da un tessuto connettivo collageno più o meno abbondante, a tratti più denso e fibroso, a tratti lasso o anche mixomatoso, riccamente vascolarizzato, includente resti non ben conservati di strutture simil-ghiandolari, molto anastomizzate, in forma di cavità cistiche o tubulari appiattite. L'interno di dette cavità era delimitato da cellule epiteliali appiattite o cuboidali, molto spesso desquamate

ed in necrosi, talvolta sovrapposte in più strati a formare ammassi cavi o cordoni solidi. Frequenti ed estese erano aree necrotiche e necrotico-emorragiche coinvolgenti lo stroma, oltre che le strutture epiteliali. Non raramente la struttura ghiandolare perdeva ogni connotazione e cellule epiteliali o loro resti si potevano rinvenire anche sparsi nello stroma, specialmente in prossimità delle avventizie dei vasi arteriosi a parete più spessa.

Nelle sedi ove meglio erano conservate, le cellule epiteliali, in prevalenza cuboidali, presentavano citoplasma abbastanza ampio, a contorni mal definiti, contenente granuli eosinofili ed ampi vacuoli. I nuclei, tondi od ovali, apparivano da vescicolosi ad ipercromatici e presentavano una certa variabilità dimensionale. Le mitosi erano molto rare.

Nella parete allantocoriale, le strutture ghiandolari proliferanti si estendevano attraverso lo stroma, fino all'avventizia dei vasi arteriosi maggiori senza penetrarvi. Non si notavano evidenti alterazioni degli epitelii coriale ed allantoideo.

Gli elementi epiteliali neoplastici, seguendo l'avventizia dei vasi si spingevano anche nel cordone ombelicale.

Non erano presenti reperti di natura flogistica.

I noduli epatici erano costituiti esclusivamente da cellule epiteliali simili a quelle delle ghiandole proliferanti, ma meglio conservate. Un sottile strato di parenchima epatico periferico alla metastasi era colpito da necrobiosi.

L'aspetto macroscopico della lesione placentare da noi riscontrata ricorda in modo molto suggestivo quello dell'iperplasia corioallantoidea dell'equino anche se raggiunge uno sviluppo di proporzioni esuberanti rispetto alla maggior parte dei reperti noti di lesioni consimili. Il nostro caso si discosta però dagli altri per la notevole estensione dei fenomeni necrotico-emorragici, per un certo grado di sdifferenziamento citologico e, soprattutto, per il carattere sicuramente neoplastico della lesione, che si estrinseca nell'invasività locale e nella comparsa di metastasi a distanza nel feto.

In precedenza Elsingerhorst (1972), descrivendo due lesioni placentari equine caratterizzate da proliferazione epiteliale, le aveva classificate una come adenoma ed una come iperplasia nodulare. Successivamente Mc Entee *et al.*, (1988), vagliando la possibile patogenesi di simili alterazioni placentari dell'equino, si sono dichiarati favorevoli all'ipotesi di una displasia epiteliale da cause ignote. Questi ultimi Autori, nel considerare con prudenza il possibile ruolo di agenti flogogeni, rilevavano inoltre che, mentre le placentiti degli equini sono abbastanza comuni, l'iperplasia allantoidea è invece molto rara. Ciononostante, sulla base di una casistica relativamente ampia e recen-

te Hong *et al.* (1993) e Shivaprasad *et al.* (1994), ritengono, al contrario, che l'iperplasia adenomatosa della placenta equina sia, nella maggior parte dei casi, espressione e conseguenza di processi infiammatori cronici.

Il caso da noi segnalato non fornisce ulteriori elementi utili a dirimere la questione eziologica di questa lesione, se non per il fatto che esso era esente da lesioni infiammatorie, sia alla placenta, che al feto. Esso merita piuttosto di essere evidenziato perchè sembra il solo tumore maligno della placenta equina, con lesioni metastatiche al feto, fino ad ora segnalato.

Se si considera plausibile l'ipotesi che questo tumore possa derivare da una lesione inizialmente iperplastica, ciò lo avvicina, dal punto di vista patogenetico, alle mole invasive ed ai coriocarcinomi umani, anche se il fatto di metastatizzare al feto è del tutto singolare e può essere forse relazionato con la particolare superficialità dei rapporti tra epitelio coriale e mucosa uterina della placenta equina.

### Bibliografia

- 1) Alison R.H., Lewis D.J., Montgomery C.A.: *Ovarian Choriocarcinoma in the Mouse*. Vet Pathol 24: 226-230, 1987
- 2) Ball V.: *Le cancer de l'uterus chez les femells domestiques*. Rev Vet J Med Vet 84: 72-78, 1932
- 3) Dricux H., Thiery G.: *Les tumeurs du placenta chez les animaux domestiques*. Rev. Path Comp 48: 445-451, 1948
- 4) Elsingerhorst T.A.M.: *Enige pathologisch-anatomische placenta-afwijkingen bij het paard*. Tijdschr Diergeneesk 97: 1317-1326, 1972
- 5) Folger A.F.: Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica, Suppl. 18:104, 1934
- 6) Gopal T., Leipold H.W., Dennis S.M.: *Hydatiform moles in Holstein cattle*. Vet Rec 107: 395-397, 1980
- 7) Hertig A.T., Mansell H.: *Tumors of the Female Sex Organs. Part I - Hydatiform Mole and Choriocarcinoma*. Armed Forces Institute of Pathology. Atlas of Tumor Pathology, Sections IX - Fasc. 33: 21-24, 1956
- 8) Hong C.B., Donahue J.M., Giles R.C.Jr., Petrites-Murphy M.B., Poonacha K.B., Tramontin R.R., Tuttle P.A., Swerczek T.W.: *Adenomatous Hyperplasia of Equine Allantoic Epithelium*. Vet Pathol 30: 171-175, 1993
- 9) Karlson A.G., Kelly M.D.: *Choriohemangioma of the bovine allantois-chorion*. J Am Vet Med Ass 99: 133-134, 1941
- 10) Kirkbride C.A., Bicknell E.J., Robl M.G.: *Hemangiomas of a bovine fetus with chorioangioma of the placenta*. Vet Pathol 10: 238-240, 1973
- 11) Kumaro N.: *Experimental induction of chorioepithelioma in pregnant rats*. Acta Obstet Gynecol Jpn 23: 32-42, 1976
- 12) Kushima K., Noda K., Makita M.: *Experimental production of chorionic tumor in rabbits*. Tohoku J Exp Med (Japan) 91: 209-214, 1967

- 137) Lindsey J.R., Wharton L.R., Woodruff J.D. Jr., Baker H.J.: *Intrauterine Choriocarcinoma in a Rhesus Monkey*. Path Vet 6: 378-384, 1969
- 14) Madarame H., Sakurai H., Konno S.: *Choriocarcinoma in a DDD mouse: a case report with immunohistochemical and ultrastructural studies*. Lab Anim Sci 39: 255-258, 1989
- 15) Marin-Padilla M., Benirschke K.: *Thalidomide induced alterations in the blastocyst and placenta of the armadillo, Dasypus novemcincus mexicanus, including a choriocarcinoma*. Am J Pathol 43: 999-1016, 1963
- 16) Mc Entee M., Brown T., Mc Entee K.: *Adenomatous Dysplasia of the Equine Allantois*. Vet Pathol 25: 387-389, 1988
- 17) Nielsen S.W., Kennedy P.C.: *Tumors of the genital system*. In: Tumors in domestic animals, ed. Moulton J.E., 3rd ed pp 510-511, University of California Press, Davis, CA 1990
- 18) Paloty J.L., Mc Nulty W.P.: *Neoplasms in nonhuman primates*. Lab Invest 26: 487-488 (Abstr.), 1972
- 19) Pirak M., Waner T., Abramowicz A., Scolnik M., Nyska A.: *Histologic and immunohistochemical study of a spontaneous choriocarcinoma in a male Sprague Dawley Rat*. Vet Pathol 28: 93-95, 1991
- 20) Riser W.H.: *Chorioepithelioma of the uterus of a dog*. J Am Vet Ass 96: 271-272, 1940
- 21) Riser W.H.: *Chorioepithelioma of the bitch*. J Am Vet Ass 100: 65-66, 1942
- 22) Robbins S.L., Argell M., Kumar V.: *Anatomia Patologica*. II ed. italiana a cura di Baroni C.D. et al., E.M.S.I., Roma, 1987
- 23) Röcken H.: *Bäldbericht: Teratombildung und gleichzeitige Trächtigkeit beim Hund*. Berl Munch Tierarztl Wchschr 86: 74, 1973
- 24) Schlotthauer C.F.: *Primary neoplasms in the genito-urinary system of dogs: a report of ten cases*. J Am Vet Med Ass 95: 181-186, 1939
- 25) Shintani S., Glass L.F., Page E.W.: *Studies of induced malignant tumors of placenta and uterine origin in the rat*. Am J Obstet Gynecol 95: 550-558, 1966
- 26) Shivaprasad H.L., Sundberg J.P., Mc Entee K., Gordon L., Johnstone A.C., Lombardo de Barros C.S., Hoffmann R.L.: *Cystic adenomatous hyperplasia of the equine allantois: a report of eight cases*. J Vet Diagn Invest 6: 107-110, 1994
- 27) Symeonidis A., Mori-Chavcz P.A.: *A transplantable ovarian papillary adenocarcinoma of the rat with ascites implants in the ovary*. J Natl Cancer Inst 13: 409, 1952-1953

# UTILIZZAZIONE DELL'ANTICORPO MONOCLONALE MIB 1 PER LA RICERCA DELL'ANTIGENE Ki-67 NEI TESSUTI NORMALI E NEOPLASTICI DI CAVALLO

SIRONI G., RICCABONI P.

*Istituto di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviaria, Milano*

Il grado di proliferazione cellulare di un tessuto patologico, ed in particolar modo di un tessuto neoplastico, è un'importante variabile biologica la cui accurata valutazione può fornire al patologo utili indicazioni. In passato, lo studio clinico della cinetica cellulare era basato sul cosiddetto "indice mitotico", sulla conta, cioè, del numero di mitosi presenti in un numero prestabilito di campi microscopici a forte ingrandimento. Col tempo, sono stati elaborati metodi più accurati quali l'incorporazione di isotopi radioattivi o di bromo-deossiridina, la cui applicazione risulta però relativamente laboriosa. In tempi più recenti l'attenzione è andata spostandosi verso metodiche quali la citometria a flusso, la conta degli organizzatori nucleari e l'identificazione immunocitochimica di antigeni presenti esclusivamente nelle cellule proliferanti (Chieco e Robutti, 1993). Tra questi i più noti sono senz'altro il Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) (Miyachi *et al.*, 1978) e l'antigene Ki-67 (Gerdes *et al.*, 1983). Quest'ultimo, in particolare, dotato di una brevissima emivita e presente in tutte le parti attive del ciclo cellulare, ma assente nella fase G0 (Gerdes *et al.*, 1984), sembrerebbe, secondo molti Autori, fornire i maggiori vantaggi. Viceversa, appare ora chiaro che PCNA è talora espresso anche da cellule a riposo (Schwartz, 1993). Le caratteristiche ricordate hanno fatto quindi dell'antigene Ki-67 il marker di proliferazione cellulare di elezione. Il principale svantaggio dell'originario anticorpo monoclonale Ki-67 è la labilità dell'epitopo da esso riconosciuto, fatto questo che ne impedisce l'impiego su tessuti fissati con formalina od altri fissativi ed inclusi in paraffina, limitandone l'uso ai soli tessuti freschi. Nel corso degli ultimi anni, sono però stati prodotti alcuni nuovi anticorpi mono- e policlonali (Key *et al.*, 1993 a, b), alcuni dei quali sono risultati in

grado di rilevare, quando utilizzati in associazione ad una tecnica di smascheramento antigenico con forno a microonde (Gerdes *et al.*, 1992; Cattoretti *et al.*, 1993), l'antigene Ki-67 in tessuti umani fissati in formalina ed inclusi in paraffina.

Immunoreattività nei confronti dell'epitopo riconosciuto dal primo degli anticorpi prodotti contro l'antigene Ki-67 è stata osservata in cellule di varie specie animali (bovino, pecora, cane, coniglio e ratto) (Falini *et al.*, 1989). Mancano tuttavia, attualmente, dati concernenti l'antigene Ki-67 nella specie equina.

Nella presente comunicazione vengono esposti i risultati di prove volte a valutare la possibilità di utilizzare uno degli anticorpi monoclonali anti Ki-67 di più recente produzione, l'anticorpo monoclonale MIB 1, per la ricerca dell'antigene Ki-67 in tessuti di cavallo fissati in formalina ed inclusi in paraffina.

Le indagini sono state svolte utilizzando la metodica Avidina-biotina perossidasi (ABC) associata alla tecnica di smascheramento antigenico con forno a microonde (Gerdes *et al.*, 1992; Cattoretti *et al.*, 1993) ed impiegando come anticorpo primario l'anticorpo monoclonale di topo MIB 1 diluito 1:50. Le prove immunoistochimiche sono state effettuate su tessuti normali di cavallo (cute, linfonodi, milza, intestino, rene, polmone, cuore, encefalo) fissati in formalina tamponata al 10% per 18-24 ore ed inclusi in paraffina. Inoltre l'immunoreattività dell'anticorpo MIB 1 è stata verificata su campioni di 56 neoplasie di cavallo pervenuti all'Istituto di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviare di Milano tra gli anni 1979 e 1993. Di tali campioni non erano noti il tempo intercorso tra il prelievo e la fissazione, il tempo di fissazione in formalina ed il tipo di formalina utilizzato.

Nei tessuti normali con distretti contenenti cellule proliferanti (cute, linfonodi, milza, intestino) l'anticorpo si è rivelato reattivo, mostrando una distribuzione della positività sovrapponibile a quella osservata in tessuti umani o di altre specie animali.

Intensa positività è stata osservata nei nuclei delle cellule basali cutanee, delle cripte intestinali, e delle aree centroblastiche linfonodali. Rarissime cellule positive sono state rinvenute inoltre nel polmone, mentre completamente negativi sono risultati rene, cuore ed encefalo.

Nella tabella I sono riportati i dati riguardanti la classificazione istologica dei campioni neoplastici esaminati ed i risultati riguardanti la loro reattività immunoistochimica nei confronti dell'anticorpo MIB 1. Su tali campioni ci si è limitati a valutare la reattività dell'anticorpo, senza effettuare alcuna preci-

	+	+/-	-
<b>Cute (23)</b>			
Papilloma squamoso	0	0	1
Basalioma	1	0	0
Adenocarcinoma sebaceo	0	0	1
Fibroma	3	1	4
Linfangioma	1	1	0
Schwannoma	3	0	1
Sarcoide	4	1	1
<b>Apparato digerente (3)</b>			
Papilloma squamoso orale	1	1	
Carcinoma squamoso gastrico	0	1	0
<b>Apparato respiratorio (4)</b>			
Schwannoma nasale	1	0	0
Carcinoma squamoso polmonare	1	1	0
Carcinoma indifferenziato polmonare	1	0	0
<b>Apparato urinario (2)</b>			
Adenoma renale	0	0	1
Carcinoma tubulare renale	0	0	1
<b>Apparato genitale (12)</b>			
Tumore a cellule di Leydig	0	0	1
Sertolioma	1	0	0
Tecoma	0	0	1
Tumore a cellule della granulosa	0	0	1
Fibroma testicolare	1	0	0
Basalioma vulvare	1	0	0
Carcinoma squamoso penieno	2	2	2
<b>Sistema endocrino (4)</b>			
Adenoma follicolare tiroideo	1	0	0
Carcinoma follicolare tiroideo	0	1	0
Feocromocitoma surrenalico	0	1	1
<b>Sistema ematopoietico (4)</b>			
Linfoma	0	2	0
Mieloma	0	1	0
Leucemia megacariocitica	1	0	0
<b>Occhio e annessi oculari (4)</b>			
Basalioma	1	0	0
Carcinoma squamoso	3	0	0
<b>Totale (56)</b>	<b>27</b>	<b>13</b>	<b>16</b>

Tabella 1 - Risultati delle indagini immunostochimiche realizzate su campioni di neoplasie benigne e maligne di cavallo. Il grado di reattività delle cellule è stato suddiviso in ottimale (+), sub-ottimale (+/-) e negativo (-). Per ogni apparato viene riportato in parentesi il totale dei campioni esaminati.

sa determinazione quantitativa delle cellule proliferanti presenti. Come ci si poteva attendere, a causa della notevole eterogeneità dei campioni per quanto attiene ai tempi di fissazione, è stata osservata una notevole variabilità della reattività, non solo in termini numerici, ma anche in relazione al grado di intensità della marcatura. Dei 56 casi esaminati, solo 40 sono risultati positivi per l'antigene Ki-67: 27 campioni hanno reagito in maniera ottimale, mostrando nuclei intensamente marcati; in 13 campioni la reazione è risultata sub-ottimale, caratterizzata cioè da una tenue marcatura del disegno cromatinico, e 16 campioni sono risultati del tutto negativi.

Oltre all'intensità della colorazione è stata osservata anche una variabilità della frequenza di cellule positive in relazione al tipo di neoplasia esaminata. Tale frequenza risultava infatti assai bassa nelle neoplasie benigne e raggiungeva invece valori, a volte elevatissimi, nei tumori maligni ad elevato grado di sdifferenziazione.

In conclusione, sulla base dei risultati ottenuti, si può affermare che: l'anticorpo monoclonale MIB 1, utilizzato in associazione alla tecnica di smascheramento antigenico in forno a microonde è in grado di evidenziare la presenza dell'antigene Ki-67 anche in tessuti di equino. Tale anticorpo potrebbe rivelarsi quindi un'utilissimo strumento per lo studio di molte patologie, soprattutto neoplastiche della specie equina.

Per quanto concerne l'esito delle prove effettuate sui campioni neoplastici selezionati dal materiale routinariamente inviato all'Istituto, elevato è il numero di casi che ha reagito negativamente (16 casi) o comunque in modo sub-ottimale (13 casi). E' noto che la fissazione in formalina per tempi superiori alle 72 ore è in grado di determinare la scomparsa di immunoreattività dell'epitopo dell'antigene Ki-67 riconosciuto dall'anticorpo MIB 1 (Cattoretti *et al.*, 1992). E' stata inoltre segnalata da alcuni altri Autori la possibilità che, nei tessuti eccessivamente fissati (48 ore anziché 24) e troppo brevemente riscaldati in forno a microonde, si possa riscontrare una riduzione, talora modesta, altre volte più consistente, del numero di cellule marcate positivamente (Munakata e Hendricks, 1993). E' presumibile che l'elevato numero di campioni neoplastici risultati negativi o marcati in modo sub-ottimale osservato nella presente prova sia da ascrivere all'elevata permanenza in formalina di tali campioni.

Sulla base della presente osservazione va quindi sottolineato che solo una rigorosa standardizzazione ed ottimizzazione dei tempi intercorrenti tra il prelievo e la fissazione e dei tempi di fissazione può permettere di ottenere quell'attendibilità di risultati che si richiede ad una valutazione quantitativa dell'immunomarcatura.

## *SUMMARY*

A series of normal tissues and 56 benign and malignant of the horse tumours, fixed in formalin and embedded in paraffin-wax, were analyzed immunohistochemically for detection of Ki-67 antigen using the Ki-67-equivalent monoclonal antibody MIB 1. In normal tissues, positive nuclei were seen in areas containing proliferating cells in skin, intestine, spleen and lymph nodes; rare positive cells were also found in lung. No positive reactions were observed in kidney, heart and brain. Forty of the 56 tumours displayed optimal or sub-optimal positive reaction for Ki-67 antigen using MIB 1. The study demonstrates, therefore, that a cell proliferation associated antigen Ki-67 is also present in horse and is immunohistochemically recognized in formalin-fixed paraffin-embedded tissues by the monoclonal antibody MIB 1. However, care must be taken in avoiding overfixation of the tissues when quantitative measurements are performed.

## *RIASSUNTO*

Vari tessuti normali ed una serie di 56 tumori benigni e maligni di cavallo, fissati in formalina ed inclusi in paraffina sono stati esaminati immunoistochimicamente per evidenziare l'antigene Ki-67, utilizzando l'anticorpo monoclonale MIB 1. Nei tessuti normali, nuclei positivi sono stati osservati in aree contenenti cellule proliferanti di cute, intestino, milza e linfonodi; alcune rare cellule sono inoltre state osservate nel polmone. Non sono invece state riscontrate reazioni positive in rene, cuore ed encefalo. Quaranta dei 56 tumori esaminati hanno reagito in modo ottimale o sub-ottimale con l'anticorpo MIB 1 mostrando cellule positive per antigene Ki-67. Il presente studio dimostra quindi che un antigene proliferazione associato Ki-67 è presente anche nel cavallo ed è immunoistochimicamente rilevabile in tessuti fissati in formalina ed inclusi in paraffina facendo uso dell'anticorpo monoclonale MIB 1. Tuttavia, quando si vogliono effettuare valutazioni quantitative della marcatura è necessario evitare la sovralfissazione dei tessuti.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Cattoretti G., Becker M.H.G., Key G., Duchrow M., Schluter C., Gallet J., Gerdes J.: *Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections.* Journal of Pathology, 168: 357-363,1992.
- 2) Cattoretti G., Pileri S., Parravicini C., Becker M.H.G. Poggi S., Bitulco C., Key G., D'Amato L., Sabattini E., Feudale E., Reynolds F., Gerdes J., Rilke F.: *Antigen unmasking on formalin fixed, paraffin embedded tissues sections.* Journal of Pathology, 171: 83-98,1993.
- 3) Chieco P., Robutti F.: *Metodi in Citologia Analitica Citomorfometria del DNA e analisi in situ dell'attività proliferativa dei tessuti solidi.* Ed. Eurocopy Bologna 1993.
- 4) Falini B., Flenghi L., Fagioli M., Stein H., Schwarting R., Riccardi C., Manocchio I., Pileri S., Pellicci P.G., Lanfrancone L.: *Evolutionary conservation in various mammalian species of the human proliferation-associated epitope recognized by the Ki-67 monoclonal antibody.* Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 37: 1471-1478, 1989.
- 5) Gerdes J., Schwab U., Lemke H., Stein H.: *Production of a monoclonal antibody reactive with human nuclear antigen associated with cell proliferation.* International Journal of Cancer, 31: 13-20,1983.
- 6) Gerdes J., Lemke H., Baisch H., Wachter H.H., Schwab U., Stein H.: *Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67.* Journal of Immunology 133: 1710-1715,1984.
- 7) Gerdes J., Becker M.H.G., Key G., Cattoretti G.: *Immunohistological detection of tumor growth fraction (Ki-67 antigen) in formalin-fixed and routinely processed tissues.* Journal of Pathology, 168: 85-86,1992
- 8) Key G., Becker M.H.G., Baron B., Duchrow M., Schluter C., Flad H.D., Gerdes J.: *New Ki-67-equivalent murine monoclonal antibodies (MIB 1-3) generated against bacterially expressed parts of the Ki-67 cDNA containing three 62 base pair repetitive elements encoding for the Ki-67 epitope.* Laboratory Investigation, 68: 629-636, 1993 a.
- 9) Key G., Larsen Petersen J., Becker M.H.G., Duchrow M., Schluter C., Askaa J., Gerdes J.: *New antiserum against Ki-67 antigen suitable for double immunostaining of paraffin wax sections.* Journal of Clinical Pathology, 46: 1080-1084,1993 b.
- 10) Miyachi K., Fritzler M.J., Tan E.M.: *Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells.* Journal of Immunology, 121: 2228-2234,1978.
- 11) Munakata S. and Hendricks J.B. (1993): *Effect of fixation time and microwave oven heating time on retrieval of the Ki-67 antigen from paraffin embedded tissue.* Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 41,1241-1246.
- 12) Schwarting R.: *Little missed markers and Ki-67.* Laboratory Investigation, 68: 597-599, 1993.

# RICERCHE ANATOMO-PATOLOGICHE SULLE PIÙ COMUNI ALTERAZIONI DELLO STOMACO DEL CAVALLO

MANDELLI G., GRIGNANI F., SCANZIANI E.,  
ENICE F., CIGOGNETTI G. (\*)

*Istituto di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviaria, Milano  
e USSL n. 7 di Lecco (\*)*

Potrebbe sembrare presuntuoso riesaminare oggi un argomento, come quello delle alterazioni gastriche del cavallo, che tanta attenzione ha ricevuto dalla clinica e dalla anatomia patologica del passato, ma occorre anche considerare che molteplici variabili, connesse con la selezione genetica, i metodi di allevamento e di impiego, l'alimentazione, i trattamenti curativi e preventivi, la frequenza dei trasferimenti ecc., incidono considerevolmente sulla evoluzione delle problematiche patologiche in tempi diversi. Senza contare che i moderni metodi di ricerca possono consentire, anche nel settore dell'anatomia patologica, tipi di approccio e di approfondimento che non erano attuabili in altre epoche. Tutto ciò giustifica, a nostro avviso, uno studio aggiornato delle lesioni gastriche reperibili nel cavallo ed, insieme, un confronto con i reperti anatomopatologici prevalenti nel passato.

Marek (1907), Joest (1919), Meyer (1938), Neumann-Kleinpaul e Schutzler (1940), Tar Borg (1941), Hutyra e Marek (1954), Nieberle e Cohrs (1961), Zakopal e Husak (1963), Lindt (1970), Wolf (1985) ecc. sottolineano la frequenza e la gravità delle *dilatazioni gastriche* del cavallo, il non raro reperto di *corpi estranei* esogeni od endogeni ed una rilevante serie di *soluzioni di continuo* nonché di *spontanee rotture* delle pareti dello stomaco, il tutto per lo più correlato a comuni ed ovvii errori alimentari.

Tra le *alterazioni metaboliche* viene sempre citata la ipertrofia idiopatica dell'esofago distale (Kitt 1905, Joest 1919, Leinati 1944, Monari et al. 1949, Smith e Jones 1957, Nieberle e Cohrs 1961, Marcato 1974 ecc.) e, per quanto concerne lo stomaco, l'occasionale riscontro di aree di necrosi, come pure la non elevata incidenza di ulcere. In anni più recenti, fermo restando il co-

munissimo riscontro della ipertrofia idiopatica dell'esofago distale, grande rilievo viene dato all'alta prevalenza di *erosioni ed ulcere gastriche*, in particolare della *pars oesophagea* e con prevalente riferimento a cavalli sportivi di ogni età, puledri compresi (Traub-Dagartz *et al.* 1985, Hammond *et al.* 1986, Collobert-Laugier *et al.* 1987, Nappert *et al.* 1989, Murray 1989, Murray *et al.* 1990, Roberts 1990, Hammond 1990, Borrow 1993, Barker *et al.* 1993, Furr *et al.* 1994 ecc.). Viene citata anche la paracheratosi della *pars esophagea* come fattore predisponente allo sviluppo delle locali ulcere gastriche (Yoshihara *et al.* 1986, Barker *et al.* 1993).

Per quanto attiene alle *alterazioni circolatorie e dei vasi ematici*, di rilevante significato permangono gli stati iperemici e gli edemi (compresi quelli da agenti chimici esogeni, quali micotossine, cloruro di sodio, pesticidi organo-clorurati, diserbanti dipiridilici ecc.), le emorragie (intramurali e/o lumenali) ed i non rari casi di trombosi ed embolia delle arterie gastriche, gli esiti delle quali sono rappresentati da infarti emorragici, necrosi, ulcere ed eventuali perforazioni.

Particolare interesse hanno suscitato le *alterazioni intramurali dei vasi ematici* e soprattutto delle piccole arterie ed arteriole della sottomucosa gastrica, ma presenti pure - anche se in forma più contenuta - nella sottosierosa, nella tonaca muscolare e nella lamina propria della mucosa. Si tratta dei precipitati calcarei "asteroidi" dell'intima (descritti già da Bollinger 1869, e poi studiati da Hobmaier 1922 e 1928, Krause 1927, Kikuchi 1928 ed altri, ed ancora riconsiderati recentemente da Jubb e Kennedy 1963, Montali *et al.* 1970, Dahme 1970, Marcato 1982, Marcato *et al.* 1983, ecc.), di ispessimenti intimali a carattere fibro-mucoide e talora anche di ipertrofia delle tonache muscolari arteriose che, nel loro insieme, possono produrre un effetto occlusivo o, quanto meno, riduttivo dei lumi vascolari (Drommer 1991), correlati o meno alle trombosi parassitarie della arteria mesenterica craniale e di altre grandi arterie addominali (Bollinger 1869, Jubb e Kennedy 1963, Dahme 1970, Estes e Cheville 1970, Montali *et al.* 1970, Marcato *et al.* 1983, Robinson e Dixie 1993). Dette alterazioni vasali sono molto frequenti, reperibili in equini di tutte le specie, razze ed età, possibile causa dei fenomeni di insufficiente perfusione della mucosa gastrica che Yoshihara *et al.* (1986) hanno evidenziato mediante angiogrammi.

Nel settore delle *gastriti* non si segnalano considerevoli variazioni rispetto alle conoscenze del passato, se non per il ritrovamento di saltuari casi di gastrite cronica eosinofila, ad eziologia non parassitaria, che Pass e Bolton (1982) e poi Wilkie *et al.* (1985) e Barker *et al.* (1993) hanno descritto, nel

quadro di una grave malattia di carattere generale, come "multisystemic eosinophilic epitheliotropic disease" (MEED).

Le forme parassitarie occupano sempre un ruolo di rilievo nella patologia gastrica degli equini, pur essendo al presente meglio controllabili attraverso l'uso di appropriati farmaci e di ben mirati programmi di trattamento. Si ricordano in proposito le nematodiasi da *Trichostrongylus axei*, tuttora riscontrabili in diverse aree geografiche (Lyons *et al.* 1991), e quelle - ancora più frequenti - da varie specie di *Habronema*: *H. muscae*, *H. microstoma* ed *H. (Draschia) megastoma*, quest'ultima responsabile di lesioni gastriche a carattere nodulare-nodoso e quindi più facilmente diagnosticabile.

Alle miasi gastriche hanno dedicato attenzione, anche in epoca recente, alcuni studiosi italiani (Guizzardi 1982, Principato 1988-90, Principato *et al.* 1984, 1985), risultando complessivamente che, sia nel nostro che in altri Paesi e Continenti, una netta prevalenza spetta, per quanto concerne il cavallo, alle specie *Gasterophilus intestinalis* e *G. nasalis*. Circa le conseguenze locali di tali forme di miasi, esse possono essere sintetizzate come segue: a) le larve di 2° e 3° stadio di *G. intestinalis* si localizzano pressoché esclusivamente nella *pars oesophagea*, attaccandosi in prevalenza alla parete anteriore di questa, mentre le larve di *G. nasalis* si fissano alla mucosa del primo tratto duodenale; b) nei punti di infissione dei loro rostri si notano piccole erosioni imbutiformi, spesso circondate da un bordo iperplastico (Principato 1988) e, all'esame istologico, segni di flogosi cronica con intensa pullulazione batterica (Shefstad 1978); c) l'attacco delle larve può, secondo alcuni autori (Dart *et al.* 1987), ma non secondo altri (Sweeney 1990), costituire sede di iniziale sviluppo di ulcerazioni gastro-duodenali; d) l'infestione da *G. intestinalis* è ritenuta responsabile, almeno in qualche caso e segnatamente nei puledri, di reflusso gastro-esofageo, che a sua volta è in grado di provocare erosioni ed ulcerazioni a carico del tratto esofageo distale (Edens e Murray 1992).

Nell'ambito dei tumori, sia la letteratura del passato che quella più recente riportano frequenti casi di carcinoma squamoso della *pars oesophagea* (Krahnert 1952, Nieberle e Cohrs 1961, Lindt 1970, Damodaran e Sundararay 1973, Moore e Kintner 1976, Nairn 1978, Meagher *et al.* 1980, Wester 1980, Wester *et al.* 1980, Tennant *et al.* 1982, Miller 1983, Schoon *et al.* 1984, Pelle 1988, Olson 1992, Barker *et al.* 1993 ecc.). Secondo Hertsch e Eidt (1976) essi rappresentano il 5% di tutti i tumori equini. Meno frequenti sono certamente i papillomi della *pars oesophagea* ed i tumori epiteliali della parte ghiandolare (adenomi ed adenocarcinomi), quest'ultimi

occasionalmente localizzati in rapporto con lesioni parassitarie da *Trichostrongylus axei* ed *Habronema (Draschia) megastoma*, come rilevato anche da Stoddard e Fulharty (1980). Vengono infine segnalati, tra i tumori connettivali, casi di linfoma e neoplasie della muscolatura liscia (leiomiomi e leiomiosarcomi) (Boy et al. 1992).

L'esposizione dei nostri risultati è preceduta da una breve descrizione dei materiali e metodi utilizzati.

## MATERIALI E METODI

Sono stati esaminati, a partire dal gennaio 1994, 104 stomaci di equini in gran parte macellati in stabilimenti lombardi, che per la provenienza risultavano così ripartiti: 72 animali importati dall'estero (Polonia, ex Unione Sovietica, Romania, ex Jugoslavia, ecc.) e 28 allevati in Italia, maschi e femmine di età compresa tra gli 8 mesi ed i 20 anni. A questi sono stati aggiunti 4 capi (tutti italiani) deceduti a seguito di gravi forme morbose e di età compresa tra i 40 giorni ed i 15 anni. Tutti i soggetti esaminati sono stati suddivisi per classi di età, sesso e provenienza in Tabella I.

Il prelievo è stato effettuato tra l'ultimo tratto dell'esofago e la prima parte del duodeno; in alcuni casi era compresa anche la parte prossimale dell'esofago.

Gli stomaci, raccolti in sede di macellazione con un criterio di campionamento a random, sono stati aperti lungo la grande curvatura, dal cardias al piloro, svuotati del contenuto e sottoposti ad un esame macroscopico completo ed alla descrizione e mappatura delle lesioni riscontrate.

I reperti di particolare gravità o di non facile diagnosi sono stati avviati all'esame istologico e fissati in formalina tamponata al 10% o in alcool 95°. L'inclusione è stata effettuata in paraffina ed i relativi blocchetti sono stati sezionati al microtomo in fettine di circa 5  $\mu$  di spessore.

Le fettine sono state sottoposte, secondo necessità, a colorazioni di tipo istologico, istochimico ed immunohistochimico. I metodi utilizzati sono stati:

1) per le colorazioni istologiche: Ematossilina-Eosina, Van Gieson (fibrille collagene); Grimelius (cellule argirofile); Weigert (fibrille elastiche); Kossa (calcio); Warthin e Starry (batteri spiraliformi);

2) per le reazioni istochimiche: Alcian-PAS secondo Mowry (mucopolisaccaridi e glicoproteine), Oil Red (lipidi);

3) per le reazioni immunohistochimiche: actina con metodo ABC.

Per le corrispondenti tecniche in dettaglio si rimanda ai trattati di Mazzi (1977) e Pallaske e Schmidel (1959) nonché al lavoro di Hsu *et al.* (1981)

Tabella I - Distribuzione dei casi esaminati per provenienza, sesso ed età.

classi d'età	CAVALLI IMPORTATI		CAVALLI INDIGENI		totale
	femmine	maschi	femmine	maschi	
fino ad 1 anno	6	4	2	12	24
da 2 a 3 anni	10	10	3	3	26
da 4 a 9 anni	3	6	2	1	12
da 10 a 15 anni	12	13	4	1	30
oltre 15 anni	6	3	1	2	12
Totale	37	36	12	19	104

## RISULTATI

Nel materiale elencato in tabella I sono state messe in evidenza, come ci si poteva aspettare, molteplici alterazioni spontanee, spesso riferibili a più reperti patologici contemporaneamente presenti nel singolo caso. Si può dire pertanto che gli stomaci risultati normali all'esame anatomico-patologico erano una minoranza.

Complessivamente, riunendo i dati provenienti dall'esame macroscopico e dagli esami microscopici, sono state individuate le alterazioni seguenti:

- 1) ipertrofia della muscolatura liscia gastroesofagea;
- 2) paracheratosi della *pars oesophagea* e del *margo plicatus*;
- 3) erosioni ed ulcere della *pars oesophagea* e del *margo plicatus*;
- 4) iperplasia del *margo plicatus*;
- 5) miasi della *pars oesophagea*;
- 6) ferite e granulomi da corpo estraneo nella parte ghiandolare;
- 7) erosioni ed ulcere nella parte ghiandolare;
- 8) gastriti;
- 9) parassiti e granulomi parassitari nella parte ghiandolare;
- 10) lesioni duodenali;
- 11) lesioni delle piccole arterie;
- 12) altre lesioni.



Fig. 1 - Cavallo, mucosa gastrica: ipertrofia e prominente dello sfintere pilorico sotto la mucosa; ulcera lineare al *margo plicatus*.

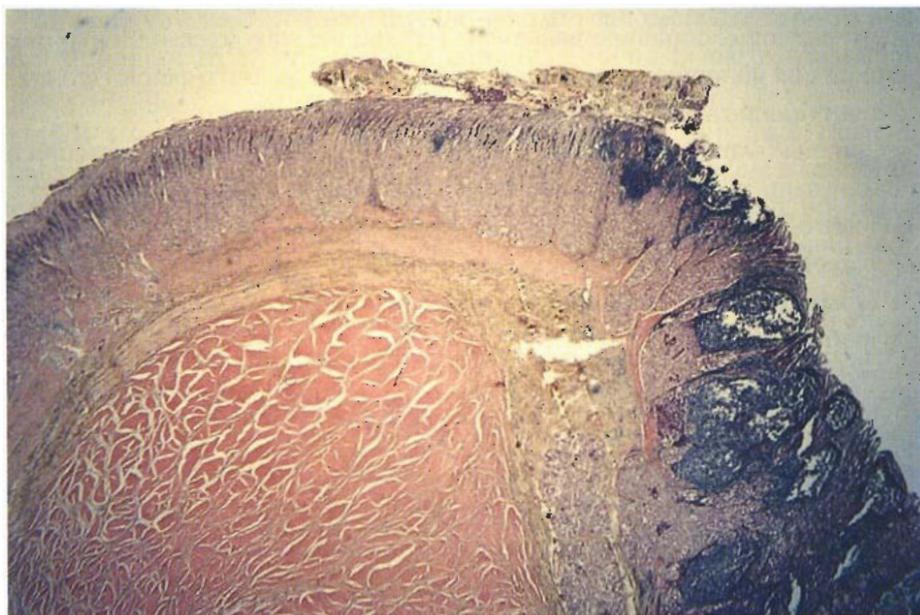


Fig. 2 - Cavallo, piloro, reperto istologico a piccolo ingrandimento, E.-E.: si noti la ipertrofia (e la prominente sub-mucosa) dello sfintere muscolare pilorico nonchè gli aspetti di lieve flogosi gastro-duodenale. La mucosa pilorica e soprattutto quella duodenale sono riccamente infiltrate di linfociti e di strutture follicolari iperplastiche .

### IPERTROFIA DELLA MUSCOLATURA LISCIA GASTROESOFAGEA

Si tratta di un reperto notoriamente assai comune negli equini, specie per quanto concerne il tratto esofageo distale che, avendo una tonaca muscolare costituita da sola muscolatura liscia, manifesta l'alterazione in forma più evidente. In pratica, l'esame macroscopico del viscere evidenzia un ingrossamento "a bottiglia" degli ultimi venti centimetri del tratto intratoracico. Il tratto colpito risulta di consistenza elevata, presenta una tonaca muscolare decisamente ispessita e di colore roseo sbiadito, mentre il lume appare discretamente stenotico e poco estensibile.

La suddetta alterazione della tonaca muscolare per lo più prosegue anche a livello di *cardias*, *pars oesophagea*, parte ghiandolare e sfintere pilorico, che a sua volta risulta frequentemente ipertrofico e stenotico (Fig. 1). L'alterazione non è più rilevabile nel tratto duodenale.

Sul piano istologico, l'alterazione appare caratterizzata da un interessamento pressoché esclusivo dello strato interno, circolare, della tonaca muscolare (Fig. 2). I miociti appaiono ingrossati, a citoplasma chiaro e talvolta anche microvacuolizzati (vacuolizzazioni Oil Red - negative). La ricerca immunostochimica per l'actina ha dimostrato la minore presenza di questo tipo di filamento intermedio negli strati muscolari interessati. La colorazione



Fig. 3 - Cavallo, piloro, reperto istologico a piccolo ingrandimento, Van Gieson: si noti l'aspetto fibrotico della lamina propria e della sottomucosa pilorica. Sepimenti di connettivo fibroso denso si addentrano, ramificandosi, nello sfintere muscolare pilorico.

con il metodo Van Gieson ha inoltre evidenziato un addensamento della trama connettivale di sostegno e talora la presenza irregolare di tratti collagene neofornati nel contesto dei fasci di fibrocellule muscolari più evidentemente ipertrofici (Fig. 3). I fenomeni di addensamento e di compenetrazione della trama connettivale coinvolgono talora anche gangli e fibre nervose intramurali.

### PARACHERATOSI

Fenomeni di evidente paracheratosi della *pars oesophagea* sono stati riscontrati in 16 casi su 104. L'alterazione era diagnosticabile macroscopicamente oltre che all'esame istologico, essendo caratterizzata da irregolare ispessimento, colorazione giallastra ed eventuali fessurazioni longitudinali e trasversali dell'epitelio di rivestimento capaci di conferire a questo un aspetto a scaglie.

Sul piano istologico appariva significativo il rigonfiamento dei cheratinociti presenti nei diversi strati dell'epitelio e la presenza di nuclei anche nelle cellule degli strati più superficiali.

La paracheratosi dell'epitelio di rivestimento della *pars oesophagea* risultava correlata, in un elevato numero di casi, con altre lesioni elementari dello stomaco più oltre descritte, quali erosioni ed ulcere della stessa *pars oesophagea* e del *margo plicatus* (Fig. 4), l'iperplasia del *margo plicatus* e la presenza di placchette di epitelio pavimentoso stratificato dislocate nella parte ghiandolare, comunque a breve distanza dal *margo plicatus*.

### EROSIONI ED ULCERE DELLA PARS OESOPHAGEA E DEL MARGO PLICATUS

Tali lesioni sono state riscontrate in un'alta percentuale degli stomaci esaminati: 80 su 104 (76,9%).

Erosioni ed ulcere della *pars oesophagea* e del *margo plicatus* sono state rilevate sia nei cavalli italiani che nei cavalli importati e tutte le età ne erano colpite, salvo una certa tendenza a prevalenze più basse nelle classi di età estreme (molto giovani e molto vecchi).

Erosioni ed ulcere risultavano presenti in numero assai variabile nel singolo caso (da una a molte), di dimensioni e forma altrettanto variabili (prevalendo la forma a "carta geografica"), per lo più localizzate in vicinanza del *margo plicatus*, raramente distribuite in modo uniforme su tutta la *pars oesophagea* (Fig. 5). In due casi sono state notate erosioni ed ulcere lineari,

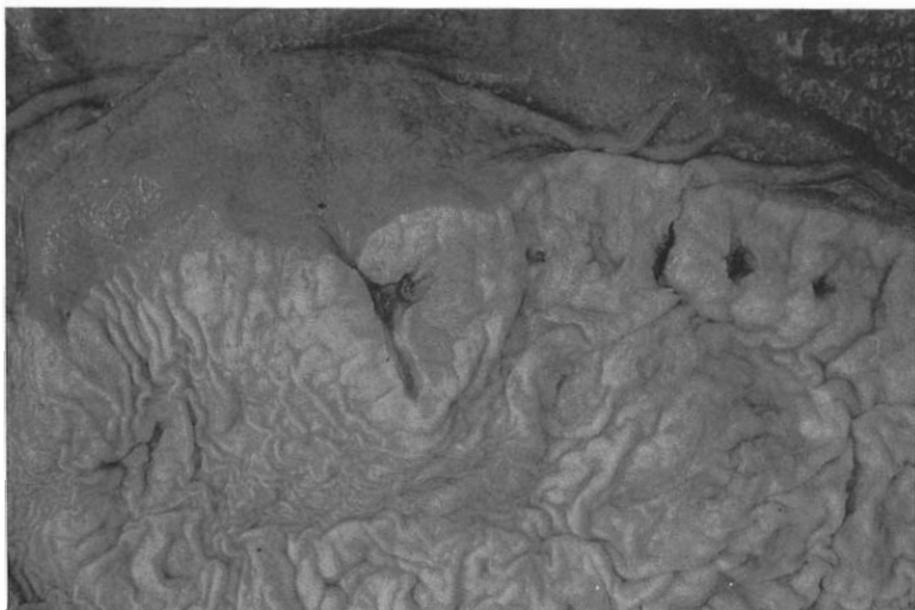


Fig. 4 - Cavallo, stomaco: la mucosa della *pars oesophagea* appare irregolarmente ispessita e paracheratosica; inoltre appare diffusamente screpolata, fessurata e percorsa, soprattutto al *margo plicatus*, da erosioni ed ulcere lineari.

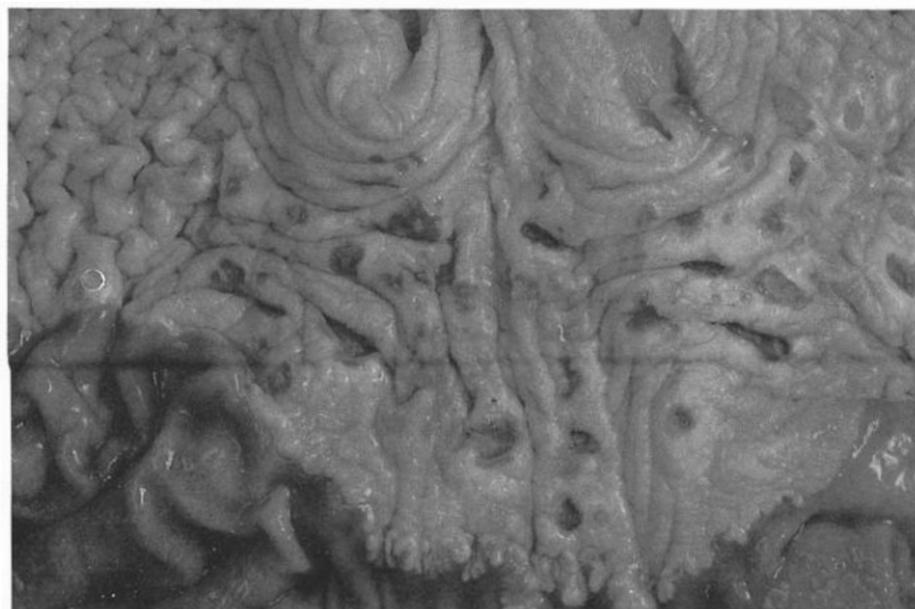


Fig. 5 - Cavallo, stomaco: la mucosa è disseminata di erosioni ed ulcere, mentre il *margo plicatus* appare irregolarmente iperplastico.

allungate longitudinalmente, anche in corrispondenza della mucosa esofagea distale. Le erosioni e le ulcere specificamente localizzate a carico del *margo plicatus* mostravano invece la tendenza ad assumere forma lineare trasversale, allungata secondo il decorso di questa peculiare zona di confine.

In nessun caso, tra quelli esaminati, sono state rinvenute ulcere perforate della *pars oesophagea* o del *margo plicatus*.

Sul piano istologico non sono emersi reperti di particolare significato a carico delle erosioni ed ulcere sopra descritte. Lungo le pareti delle erosioni e delle ulcere sono stati spesso visualizzati corpi vegetali e batteri, mai ife fungine. Nelle ulcere di maggiore ampiezza erano puntualmente riscontrabili fenomeni trombotici dei vasi ematici ai margini e sul fondo della perdita di sostanza. Ovviamente, la lamina propria o la sottomucosa coinvolte presentavano aspetti di flogosi reattiva con infiltrazione di granulociti, proliferazione di tessuto di granulazione, infiltrati linfocitari e macrofagici, ecc., a testimonianza che si trattava quasi sempre di lesioni recenti.

#### IPERPLASIA DEL MARGO PLICATUS

E' stata osservata in un discreto numero di casi: 33 su 104 (31,7%), risultando spesso associata a fenomeni di paracheratosi dell'epitelio di rivestimento della *pars oesophagea* e conseguendo forse a ripetuti fenomeni erosivi e riparativi della zona interessata (Fig. 5).

All'esame istologico l'aspetto irregolarmente esuberante del *margo plicatus* appariva rappresentato da ispessimenti "a cascata", aggettanti sul bordo della parte ghiandolare.

#### MIASI DELLA PARS OESOPHAGEA

*Gasterophilus intestinalis* è stato riscontrato, per lo più sotto forma di insediamenti di larve di terzo stadio o più raramente di secondo e terzo stadio mescolate tra loro, in 34 soggetti su 104 (32,6%).

I cavalli di provenienza straniera erano più colpiti di quelli nazionali ed, in generale, quelli di giovane età rispetto ai maturi ed agli anziani. Per quanto concerne l'incidenza stagionale della parassitosi, si segnala che reperti positivi sono stati trovati da dicembre a maggio con una punta di massima incidenza nel bimestre febbraio-marzo: 11 su 20 (55,0%).

Un reperto caratteristico, poco segnalato in letteratura, è stato quello di una prevalente localizzazione delle larve sulla parete anteriore della *pars oesophagea*.

Le lesioni causate dalle larve nei loro punti di attacco hanno mostrato una certa variabilità di aspetti, fenomeno già largamente segnalato in letteratura: prevalevano le erosioni semplici, di tipo piano; talvolta attorno al punto di attacco emergeva distintamente un regolare rilievo ad anello costituito da tessuto di granulazione lassamente infiltrato di granulociti eosinofili; in rari casi, punti di attacco tra loro vicini inducevano la formazione di veri granulomi, nel contesto dei quali era talvolta possibile individuare delle colonie batteriche.

Circa la possibilità che erosioni ed ulcere della *pars oesophagea* fossero direttamente condizionate dalle suddette lesioni di origine parassitaria, dall'esame del materiale di studio non sono emersi elementi a sostegno di una correlazione positiva.

### *FERITE E GRANULOMI DA CORPO ESTRANEO NELLA PARTE GHIANDOLARE*

Soluzioni di continuo da alimenti grossolani sono state osservate in 14 soggetti su 104 esaminati (13,4%). Si trattava per lo più di ferite lineari o tragitti sanguinolenti compresi nello spessore della mucosa (Fig. 6), più raramente di vere e proprie incisioni rettilinee della lunghezza di qualche centimetro ed interessanti anche la sottomucosa ed eventualmente anche la tonaca muscolare. Le lesioni meno recenti apparivano esenti da tracce di sangue, con margini rimboccati verso l'interno ed eventualmente scavate anche dal succo gastrico. Si può ritenere che dette lesioni, quasi tutte di aspetto relativamente recente, fossero causate dall'uso di foraggi impropri in coincidenza con fasi di concentramento e lungo trasporto dei cavalli con autoveicoli od in ferrovia, prima di giungere nella sede di macellazione.

Ulteriore manifestazione di tali eventi stressanti sono da considerare i granulomi da corpi estranei vegetali rilevati all'esame istologico: 10 casi su 76 esaminati (13,1%).

Dal punto di vista istologico apparivano centrati attorno a strutture vegetali filamentose profondamente addentrate nella lamina propria od anche nella sottomucosa della parte ghiandolare, in un caso penetrate fino alla sottosierosa gastrica dopo avere attraversato la tonaca muscolare. Istologicamente il corpo estraneo vegetale appariva circondato da cellule giganti multinucleate, da macrofagi di tipo epitelioidi e da una capsula connettivale delimitante (Fig. 7).



Fig. 6 - Cavallo, regione pilorica: la mucosa mostra una recentissima ferita da corpo estraneo vegetale.

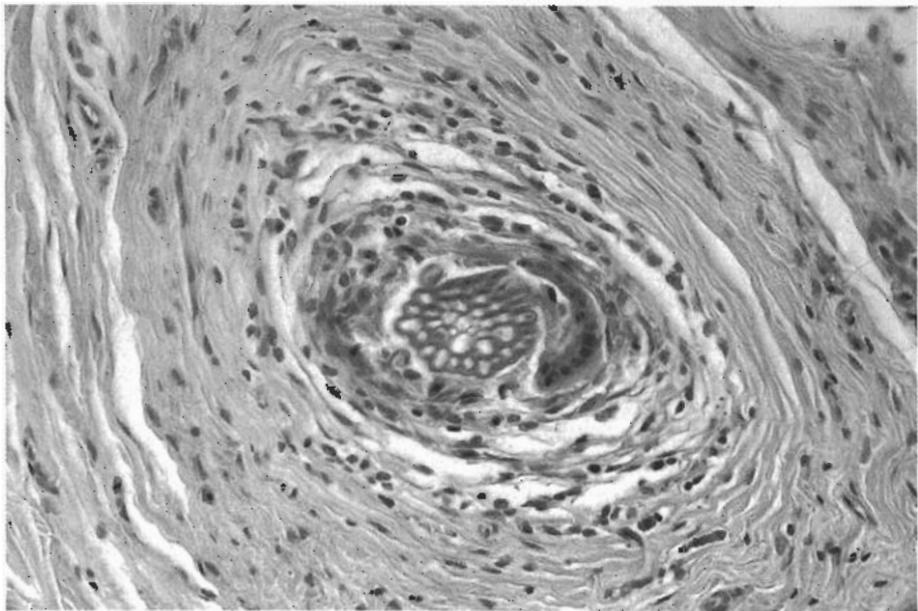


Fig. 7 - Cavallo, stomaco, reperto istologico di sottomucosa della parte ghiandolare, medio ingrandimento, E.-E.: granuloma da corpo estraneo vegetale.

## EROSIONI ED ULCERE DELLA PARTE GHIANDOLARE

Erano presenti in 26 soggetti su 104 (25,0%), cioè in numero sensibilmente inferiore a quello presentato dalle erosioni ed ulcere della parte esofagea, come d'altra parte risulta in analoghe rassegne della stampa scientifica internazionale. Si trattava per lo più di erosioni ed ulcere di modeste dimensioni, di forma tondeggianti od ellissoidale, variamente distribuite sulla mucosa di tipo ghiandolare, quasi sempre uniche e recenti (iperemico-emorragiche) (Fig. 8). In un solo caso è stata trovata un'ulcera di grandi dimensioni, crateriforme, a margini rimboccati, di aspetto calloso e non sanguinante, situata ai confini tra regione cardiaca e regione fundica, vicino alla grande curvatura.

In altri casi sono state individuate, soprattutto nella regione pilorica, cicatrici conseguenti alla guarigione di ulcere gastriche di vecchia data.

Anche a carico delle ulcere della parte ghiandolare, l'esame istologico delle mucose interessate non ha evidenziato reperti di particolare significato eziologico, quali parassiti, colonie batteriche, corpi fungini, corpi estranei, ecc.

In due casi sono state rilevate erosioni ed ulcere anche nel duodeno, ma con le stesse caratteristiche macro e microscopiche prevalenti nella parte ghiandolare dello stomaco.

## GASTRITI

Fenomeni gastritici sono stati osservati in un elevato numero di casi interessando equini di ogni età e provenienza. Complessivamente tali lesioni figuravano in 88 cavalli su 104 esaminati (84,6%), prevalendo di gran lunga le forme catarrali croniche su altri tipi di gastroduodeniti (forma catarrale acuta, forma emorragica, ecc.).

Si trattava quindi, nella maggior parte dei casi, di forme relativamente lievi, probabilmente correlate ad alcuni dei fattori eziologici già menzionati nella presente rassegna, quali microtraumatismi da foraggio grossolano, presenza di erosioni ed ulcere, parassitosi gastriche, ecc.).

All'esame istologico figuravano in molti casi, oltre ai consueti reperti delle flogosi sopra menzionate, infiltrati e follicoli linfocitari neofornati nella mucosa del *margo plicatus* e soprattutto in quella pilorica, con il probabile significato di avamposti del sistema immunitario in rapporto con zone critiche di esposizione delle stesse mucose al contatto con antigeni microbici, parassitari, alimentari, ecc.



Fig. 8 - Cavallo, stomaco, regione del fondo: piccola ulcera, a margini lievemente arrotondati, ma con ampio alone iperemico, da considerarsi relativamente recente.

Poiché analoghi reperti infiltrativo-proliferativi gastroduodenali sono segnalati nella letteratura internazionale in coincidenza con infezioni da batteri spirillari, è stata applicata a sezioni campione del tratto piloro-duodeno la colorazione di Warthin-Starry, ma senza riscontri positivi.

Un solo caso di gastrite catarrale cronica merita una menzione particolare ed è quello, recentemente osservato, di una flogosi spiccatamente iperplastica, caratterizzata da un intreccio di delicati rilievi cordoniformi della mucosa ed, istologicamente, da aree di moderata fibrosi della lamina propria con iperplasia ghiandolare probabilmente secondaria.

#### *PARASSITI E GRANULOMI PARASSITARI DELLA PARTE GHIANDOLARE*

Nematodi di piccole dimensioni, riferibili alla specie *Habronema microstoma*, sono stati reperiti in 3 casi su 104 (2,8%) nella mucosa della regione fundica e della parte pilorica. Si trattava di un limitato numero di esemplari che, d'altra parte, non sembravano aver suscitato in sede di localizzazione reazioni di particolare tipo o intensità.

Nelle sezioni istologiche della parte ghiandolare relative ad altri 4 sog-

getti sono state individuate sezioni di nematodi di genere e specie non determinati.

Per quanto riguarda i granulomi parassitari individuati istologicamente nella stessa parte di stomaco, si è trattato di sei casi caratterizzati da lesioni del tutto sovrapponibili. Esse consistevano in densi infiltrati di granulociti eosinofili il cui centro appariva talora occupato da sezioni di larve di nematodi (probabilmente larve di strongili) accompagnate da qualche cellula gigante da corpo estraneo e da un certo numero di cellule epitelioidi. Perifericamente il granuloma era delimitato da una più o meno spessa capsula di tessuto connettivo fibroso. Tali granulomi erano per lo più situati superficialmente, nello spessore della lamina propria, ma in qualche caso, per le loro notevoli dimensioni, sconfinava anche nella sottomucosa.

### LESIONI DUODENALI

Quantunque l'argomento trattato sia rivolto allo studio delle lesioni gastriche degli equini, non si è potuto ignorare la presenza di alcune alterazioni nel tratto duodenale rimasto attaccato al piloro. Le più comuni alterazioni quivi riscontrate sono state:

1) le miasi da *Gasterophilus nasalis* e relative erosioni al punto di attacco delle larve sulla mucosa (11 casi su 104, pari al 10,5% dei soggetti esaminati).

2) molteplici alterazioni dell'ampolla di Vater, consistenti in *iperplasie*, talvolta a carattere poliposo, delle mucose coinvolte (mucosa duodenale, mucosa del tratto distale del coledoco, mucosa del tratto distale del dotto pancreatico principale), fenomeno rilevato in 6 casi su 104 (5,7%), per lo più riferibili a soggetti anziani; reperti di *metaplasia squamosa* dell'epitelio dell'ampolla, per la verità di limitata estensione (1 caso su 6 esaminati); una piccola *cisti mucosa*, anch'essa rilevabile solo istologicamente (1 caso su 6 esaminati);

3) *granulomi parassitari* con le stesse caratteristiche descritte nella parte ghiandolare dello stomaco (5 soggetti positivi su 37 esaminati, pari al 13,3%);

4) *granulomi da corpo estraneo* sono stati visualizzati istologicamente in 2 soli casi su 37 esaminati (5,4%), avendo le stesse caratteristiche di quelli descritti nella trattazione della parte ghiandolare dello stomaco.

5) *duodeniti* (19,2%), per lo più di tipo catarrale cronico, almeno in parte correlate alle patologie parassitarie e da corpo estraneo sopra menzionate.

## LESIONI DELLE PICCOLE ARTERIE

Come risulta già ampiamente segnalato in letteratura, gli equini presentano frequenti lesioni arteriose nel tratto gastroenterico.

Anche i casi da noi studiati esibivano tale peculiarità in un elevato numero di riscontri positivi (85,8%).

Occorre dire che si tratta di lesioni riscontrabili solo istologicamente e riferibili principalmente a precipitati calcarei asteroidi subendoteliali con ispessimenti intimali. E' un reperto molto comune, consistente nella presenza di precipitazioni calcaree granulari nell'intima di arterie ed arteriole intramurali della *pars oesophagea*, della regione del fondo, della parte pilorica, del piloro e soprattutto del duodeno. Ne sono colpite, in misura decrescente, le piccole arterie della sottomucosa, piccole arterie ed arteriole della sottosierosa e della tonaca muscolare, arteriole della lamina propria della mucosa. Le venule e vene non sono mai interessate, come pure nessuna lesione di questo tipo è presente lungo le vie linfatiche (Fig. 9).

Nel materiale di studio la precipitazione di sali di calcio, bene visualizzabile soprattutto con il metodo Kossa, si realizza dapprima con la formazione di una sorta di piccolo guscio calcareo attorno ad un "nucleo centrale", verosimilmente costituito da detrito cellulare, poi con la calcificazione dell'intera formazione e con lo sviluppo di apposizioni calcaree radiali, che conferiscono il caratteristico aspetto "asteroide" alle formazioni completamente mature (Fig. 10).

L'endotelio di ogni sezione arteriosa interessata può contenere da uno a più precipitati asteroidi, variamente distribuiti lungo la circonferenza dell'intima. Alla formazione dei precipitati è non di rado associato un ispessimento edematoso dell'intima stessa, che in realtà è dovuto alla deposizione di abbondante matrice amorfa (Alcian +) al di sotto dell'endotelio (Fig. 11). Quest'ultimo risulta irregolarmente sollevato e sospinto verso l'asse luminale. Il lume delle piccole arterie e delle arteriole risulta pertanto assai ridotto e talora quasi completamente scomparso, mentre le pareti vasali appaiono ispessite anche per una concomitante ipertrofia della loro muscolatura liscia. Altre volte i suddetti ispessimenti intimali sembrano svilupparsi indipendentemente dai precipitati asteroidi (Fig. 12).



Fig. 9 - Cavallo, stomaco, reperto istologico di sottomucosa, piccolo ingrandimento, E.-E.: piccola arteria con evidente precipitato asteroide nell'intima, mentre le vicine pareti della vena satellite non appaiono colpite.

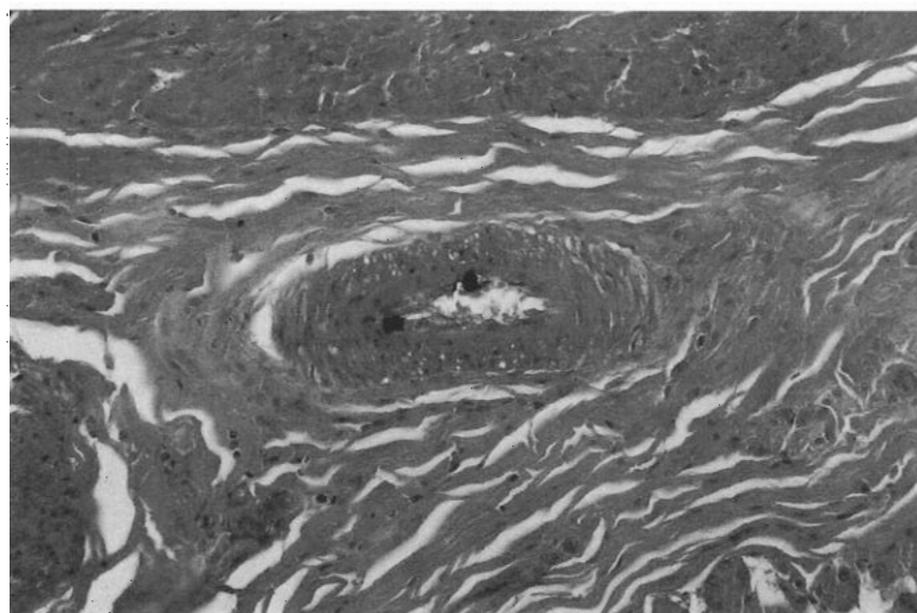


Fig. 10 - Cavallo, stomaco, reperto istologico di sottomucosa, piccolo ingrandimento, Kossa: piccola arteria con due evidenti precipitati asteroidi nell'intima.

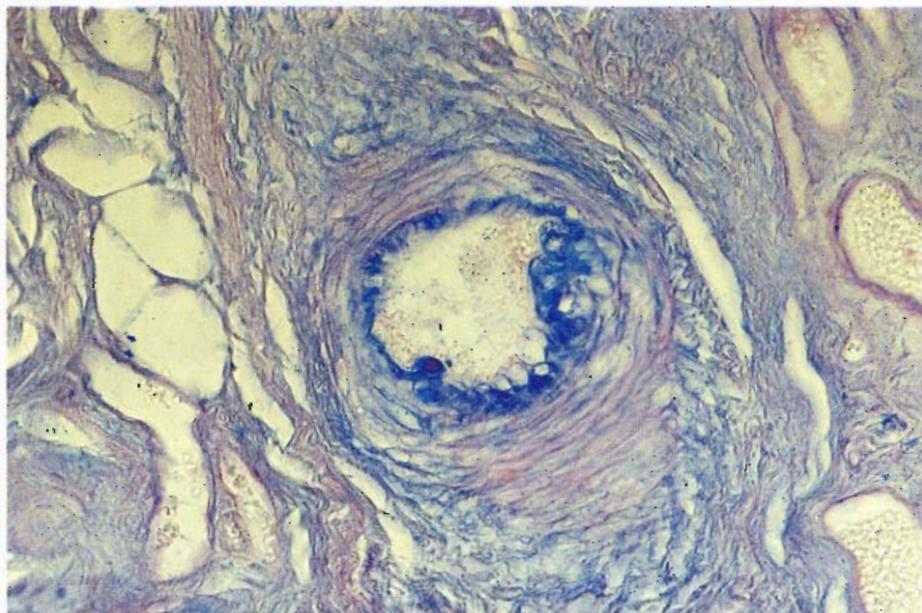


Fig. 11 - Cavallo, stomaco, reperto istologico di sottomucosa, piccolo ingrandimento, Alcian-PAS: piccola arteria con precipitato asteroide centralmente PAS-positivo e diffusa alcianofilia dell'intima, che appare ispessita da un cuscinetto cellulare.

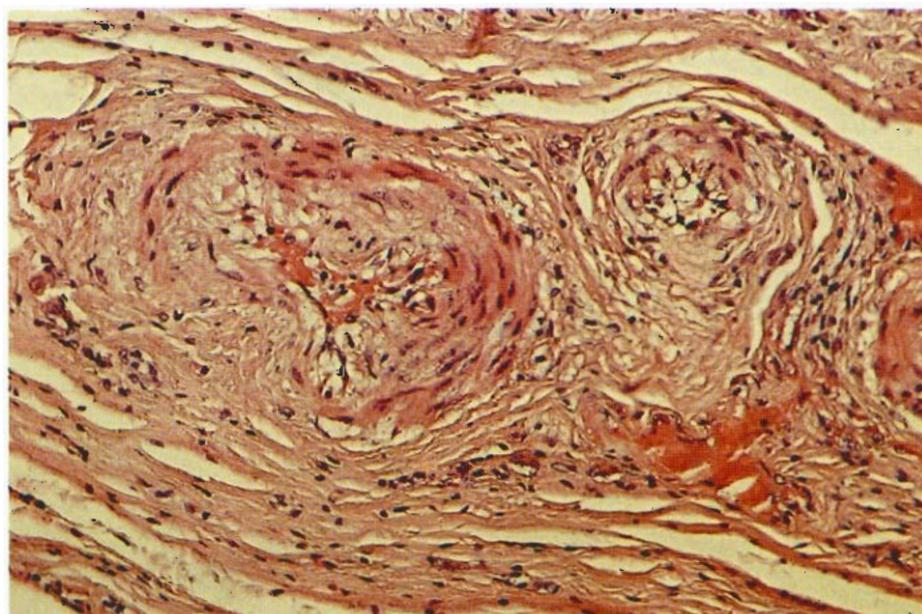


Fig. 12 - Cavallo, stomaco, reperto istologico di sottomucosa, medio ingrandimento, E.-E.: gruppo di piccole arterie, le cui lesioni (ispessimento intimale, ipertrofia muscolare, fibrosi avventiziale) causano evidente riduzione luminale.

## ALTRE LESIONI

Dopo aver esaminato in dettaglio i differenti reperti anatomopatologici riscontrati nel materiale della tesi, rimane un gruppo di alterazioni riscontrate in pochi casi. Si tratta in totale di 9 reperti (8,6%), così distribuiti: un linfoma dei linfonodi gastrici, un linfangioendotelioma intramurale, due piccoli lipomi omentali, due reperti di *haemomelasma ilei*, una dilatazione gastrica e due piccole cisti della mucosa ghiandolare nella regione del fondo.

Tabella II - Più comuni lesioni gastriche riscontrate nel presente materiale di ricerca, in ordine decrescente di prevalenza

Ipertrofia della muscolatura liscia gastro-esofagea	89,4 %
Molteplici lesioni delle piccole arterie	85,8 %
Gastriti	84,6 %
Erosioni ed ulcere della <i>pars oesophagea</i>	76,9 %
Miasi da <i>Gasterophilus intestinalis</i>	32,6 %
Iperplasia del <i>margo plicatus</i>	31,7 %
Paracheratosi della <i>pars oesophagea</i>	15,3 %
Ferite recenti da corpo estraneo nella parte ghiandolare	13,4 %
Granulomi da corpo estraneo nella parte ghiandolare	13,1 %
Granulomi parassitari gastrici	7,8 %
Habronemiasi	2,8 %
Altre	8,6 %

Tabella III - Più comuni lesioni duodenali riscontrate nel presente materiale di ricerca, in ordine decrescente di prevalenza.

Molteplici lesioni delle piccole arterie	100,0 %
Duodeniti	19,2 %
Granulomi parassitari duodenali	13,3 %
Miasi da <i>Gasterophilus nasalis</i>	10,5 %
Molteplici lesioni ampolla di Vater	5,7 %
Granulomi da corpo estraneo nel duodeno	5,4 %

## CONSIDERAZIONI

I risultati delle presenti ricerche dimostrano ancora una volta che lo stomaco ed il duodeno del cavallo sono tuttora frequentemente sede di processi patologici di diversa natura. Rispetto alle indagini condotte nel passato sono certamente diminuite le forme parassitarie (Sweeney, 1990) e ciò in relazione all'attuale disponibilità di farmaci di indubbia efficacia. Tuttavia le altre lesioni, ed in particolare quelle più note (flogosi, erosioni ed ulcerazioni,

ipertrofia della muscolatura liscia gastroesofagea, lesioni vasali, ecc.), conservano intatta la loro prevalenza ovvero tendono anche ad aumentarla come avviene per le erosioni ed ulcere gastriche dei cavalli sportivi (Collobert *et al.* 1986; Murray, 1989; Murray *et al.*, 1990; Nappert *et al.*, 1990, ecc.).

Un quesito che si pone inevitabilmente a questo punto riguarda il problema se tutte le lesioni riscontrate nel corso delle presenti ricerche e riportate in ordine decrescente di prevalenza nelle Tab. II e III siano da considerare alla stregua di altrettante variabili indipendenti ovvero risultino almeno in parte fra loro collegate. Sarebbe soprattutto interessante poter dedurre se le lesioni più gravi e di assai elevata incidenza, cioè le erosioni ed ulcere della *pars oesophagea* e del *margo plicatus* (76,9%) da un lato, e le erosioni ed ulcere della parte ghiandolare (25,0%), dall'altro, dipendano a loro volta da altre alterazioni presenti nello stomaco o ne siano a propria volta la causa. I dati reperiti in letteratura e quelli emergenti dalle nostre osservazioni tenderebbero a sostanziare l'ipotesi che, in realtà, pochi fattori patologici primari, più o meno strettamente correlati tra loro, siano alla base delle lesioni di più comune occorrenza. Prima di addentrarci in tale complessa disamina, conviene tuttavia sottoporre ad una valutazione conclusiva le alterazioni più frequenti e di maggiore interesse anatomo-patologico rilevate in una adeguata serie di stomaci equini.

### *IPERTROFIA DELLA MUSCOLATURA GASTROESOFAGEA*

La letteratura sull'argomento menziona in pratica solo l'ipertrofia della tonaca muscolare esofagea ed in particolare dello strato interno, circolare, della medesima. In realtà, nel materiale di studio da noi utilizzato, risulta chiaramente che l'ipertrofia esofagea è quasi sempre accompagnata da una analoga alterazione della muscolatura liscia gastrica e pilorica. Soprattutto a livello pilorico l'ipertrofia ed un certo grado di fibrosi del corrispondente sfintere muscolare sarebbero in grado di provocare, dal punto di vista funzionale, una certa tendenza alla stasi del contenuto alimentare.

Pertanto gli sforzi peristaltici dello stomaco e dell'esofago distale potrebbero indurre, come comunemente avviene a carico di tali visceri, una ipertrofia muscolare secondaria, finalizzata al tentativo di superamento delle aumentate resistenze distali. Che un certo grado di stenosi pilorica, su base ipertonica o spastica, possa condizionare primitivamente le corrispondenti alterazioni adattive dello stomaco ed anche dell'esofago, appare dimostrato dal fatto che nei tratti successivi del canale enterico, e segnatamente nel duodeno, i fenomeni di ipertrofia muscolare liscia scompaiono bruscamente.

A quali fattori patologici possano essere riferiti i suddetti fenomeni di ipertrofia e stenosi pilorica, dai dati delle presenti ricerche nulla emerge di concreto. Nè porterebbe maggiore chiarezza alla definizione del problema qualche ulteriore ipotesi che chiamasse in causa processi flogistici cronici del piloro ed eventuali disturbi del sistema nervoso vegetativo.

### *LESIONI DELLE PICCOLE ARTERIE*

In un'alta percentuale di casi (85,9%) sono state rilevate, in particolare nella sottomucosa gastro-duodenale, ma in qualche misura anche a carico della sottosierosa, della muscolare e della lamina propria, alterazioni sistemiche delle piccole arterie ed arteriole, consistenti in ipertrofie muscolari, ispessimenti intimali e, spesso, anche precipitati calcarei intimali sotto forma dei cosiddetti corpuscoli asteroidi. Tali lesioni sono ampiamente documentate dalla letteratura del passato (Bollinger 1864, Hobmaier 1928, Krause 1927, Kikuchi 1928 ecc.) ed anche da quella più recente (Dahme 1970, Estes e Chevillie 1970, Montali et al. 1970, Marcato et al. 1983, ecc.), trovando una precisa caratterizzazione, anche sul piano istochimico ed ultramicroscopico, nel capitolo dell'apparato cardiocircolatorio elaborato da Drommer (1991) per il trattato di anatomia patologica veterinaria di Schultz (1991).

Rimane impregiudicato se dette lesioni delle piccole arterie ed arteriole possano dipendere dal passaggio in circolo di metaboliti parassitari provenienti dalle larve di *Strongylus vulgaris* (quarto e quinto stadio) annidate nel tronco dell'arteria mesenterica craniale, ma anche di altre arterie derivate dall'aorta addominale.

E' stato comunque accertato (Yoshihara *et al.*, 1986) che lo stomaco equino soffre frequentemente di stati di insufficiente perfusione ematica, come è possibile dimostrare mediante angiogrammi. Non si può escludere che i suddetti stati di insufficiente perfusione dipendano proprio dalle alterazioni comunemente presenti nelle piccole arterie ed arteriole, come più sopra indicato.

### *GASTRODUODENITI*

Sono anch'esse molto frequenti e probabilmente causate da fattori patogeni diversi.

Tra questi un posto di rilievo occupano certamente i foraggi grossolani e le frequenti localizzazioni parassitarie (*Gasterophilus*, *habronema*, ecc.), ma non vanno certamente dimenticati gli errori alimentari che, non tanto nei

soggetti da noi esaminati, quanto nei cavalli sportivi, verrebbero compiuti con preoccupante frequenza, come rilevato anche in epoca recente da Coenen (1990, 1992). Si tratterebbe soprattutto di alimenti concentrati somministrati, anche in ragione di due e più chilogrammi al giorno, in un'unica soluzione invece che distribuiti nell'arco di tre o quattro pasti, come sarebbe invece auspicabile da un punto di vista fisiologico. La presenza di un'unica massa di concentrato bloccherebbe o rallenterebbe considerevolmente la motilità gastrica, favorendo nel contempo lo sviluppo di fenomeni digestivi e fermentativi anomali con conseguente liberazione di metaboliti tossici.

Non va dimenticato che le stesse erosioni ed ulcere, così frequentemente riscontrate nella *pars oesophagea* e, con prevalenza sensibilmente minore, nella parte ghiandolare dello stomaco equino, potrebbero esse stesse esercitare un intenso stimolo flogogeno, come è stato dimostrato anche in altre specie animali.

Si consideri infine che, sempre per quanto concerne i cavalli sportivi, anche il frequente impiego di antiflogistici, steroidei o non steroidei, somministrati attraverso diverse vie, potrebbe essere alla base dei quadri gastrici sopramenzionati, senza contare che gli abusi di cui sopra sarebbero in taluni casi responsabili anche di erosioni ed ulcerazioni gastriche.

#### *EROSIONI ED ULCERE (PARS OESOPHAGEA E PARTE GHIANDOLARE)*

Per quanto concerne il nostro materiale di studio, tali lesioni sono state riscontrate nel 76,9% dei casi a livello di *pars oesophagea* e nel 25,0% a carico della parte ghiandolare: in totale, tenuto conto delle sovrapposizioni, oltre il 90% di reperti positivi. Erano colpiti cavalli da macello di importazione, come pure soggetti allevati in Italia, senza differenze sostanziali tra maschi e femmine e tra soggetti di differenti classi di età.

Nella maggior parte dei casi si trattava di erosioni ed ulcere di forma irregolare e di ampiezza assai variabile, localizzate in vicinanza del *margo plicatus*, ma non sono mancati i casi di ulcere anche multiple, disseminate in diverse aree della *pars oesophagea*. Meno frequenti e quasi sempre meno ampie risultavano, come già si è detto, le ulcere della parte ghiandolare.

Non si sono mai rinvenute ulcere perforate né quadri di grave gastrorragia connessi con le stesse, mentre non sono mancati riscontri di ulcere in via di guarigione, giustificando l'opinione che nella maggior parte dei casi dette lesioni guariscano spontaneamente. Ciò è confermato anche dalla letteratura ed in particolare da ricerche cliniche del tipo monitoraggio effettuate su ca-

valli sportivi con l'ausilio del metodo endoscopico (Murray, 1989; Murray et al., 1990; Roberts, 1990; ecc.).

Circa le cause delle ulcere gastriche degli equini, i dati bibliografici da noi raccolti sull'argomento tendono a responsabilizzare maggiormente i fenomeni di stress provocati da defatiganti pratiche di allenamento, ovvero l'improprio uso di certi farmaci, piuttosto che le preesistenti soluzioni di continuo della mucosa provocate da parassiti, corpi estranei alimentari, ecc. Stress e farmaci agirebbero sui mediatori chimici dello stomaco aumentando la quantità e l'acidità del succo gastrico, nei confronti del quale la mucosa della *pars oesophagea* è meno protetta della mucosa della parte ghiandolare.

Ulteriori fattori pro ulcerogeni, da considerare con grande attenzione, sono quelli alimentari, rappresentati nella fattispecie da errori nella composizione e nella distribuzione del concentrato, particolarmente nel caso in cui venga somministrato in un'unica soluzione giornaliera. Secondo Coenen (1992), in queste condizioni, digestione e peristalsi gastrica vengono sensibilmente rallentate e tra i metaboliti che derivano da tumultuosi processi fermentativi figurano rilevanti quantità di acido butirrico. Questo acido organico svolgerebbe un intenso effetto antiproliferativo sulla mucosa della *pars oesophagea* e della parte ghiandolare, deprimendo il ricambio cellulare a livello di strati superficiali dell'epitelio di rivestimento ed esponendo pertanto gli stessi ad un più intenso processo di autodigestione da parte dei succhi gastrici.

Non sono da trascurare, in qualità di fattori predisponenti allo sviluppo delle ulcere, la paracheratosi della *pars oesophagea* (Yoshihara *et al.*, 1986; Barker *et al* 1993) e, per quanto riguarda in particolare le meno frequenti ulcere della parte ghiandolare dello stomaco, la stasi alimentare da stenosi pilorica o da lesioni ostruttive duodenali, il reflusso di bile e soprattutto gli stati di cattiva perfusione ematica della mucosa e sottomucosa gastrica, già discussi all'inizio del capitolo.

Poichè le ulcere gastriche sono risultate complessivamente il processo patologico più frequente e grave da noi rinvenuto nel corso delle presenti ricerche, si è ritenuto opportuno riunire in un unico schema tutti i fattori causali o predisponenti che potrebbero essere ragionevolmente implicati nello sviluppo di tali patologie (schema n°1).

Il fatto che lo schema sia stato costruito soprattutto sulla base di dati della letteratura, accumulatisi in questi ultimi anni sull'argomento della patologia gastrica degli equini sportivi, non infirma certamente la sua validità anche per i cavalli da carne da noi studiati. Infatti, se i cavalli sportivi sono sotto-

posti ai violenti stress dell'allenamento e delle gare, i cavalli da carne patiscono stress certamente non inferiori in relazione alle condizioni talora primitive di allevamento e nel corso delle varie tappe che conducono al macello: concentrazione in aree di raccolta, carico su mezzi di trasporto per nulla confortevoli e privi di qualsiasi protezione nei confronti dei rigori stagionali, precarie condizioni di alimentazione e di abbeverata, eventuali cambi di mezzo di trasporto per arrivare al macello, inadeguato riposo nelle stalle di sosta dei macelli, sempreché queste siano disponibili e vengano effettivamente utilizzate.

In conclusione, omettendo di commentare le altre lesioni elencate nelle tabelle II e III, in quanto già discusse in sede di descrizione dei reperti ovvero già coinvolte nello schema patogenetico n° 1, riteniamo di poter sostenere che anche nei cavalli da carne le alterazioni gastriche di maggiore impatto, e più o meno tra loro correlate, conseguono in misura non esigua alle condizioni di stress cui gli animali sono sottoposti in coincidenza con le varie fasi di allevamento e soprattutto durante i trasferimenti che precedono la macellazione, pur essendo chiaro che si tratta di patologie tipicamente polifattoriali.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Barker I.K., Van Dreumel A.A. & Palmer N. - "The alimentary system". In: Jubb et al. - Pathology of domestic animals, 4th ed., Academic Press, New York 1993
- 2) Bollinger O. (1869), citato da Dahme E., 1970
- 3) Borrow H.A. - "Duodenal perforations and gastric ulcers in foals". Vet. Rec. 1993, 132: 12, 297-299
- 4) Boy M.G., Palmer J.E., Heyer G., Hamir A.N. - "Gastric leiomyosarcoma in a horse". J.A.V.M.A. 1992, 200: 9, 1363-1364
- 5) Collobert C., Gillet J.P., Vaissaire J., Collobert J.F. - "Quoi de neuf en matière d'études et de recherches sur le cheval?" 13 journée d'étude, 11 mars 1987, 95-110
- 6) Coenen M. - "Occurrence of gastric ulcers of nutritional origin in horses". Schweiz. Arch. f. Tierheil. 1990, 132: 3, 121-126
- 7) Coenen M. (1992) - "Observations on the occurrence of gastric ulcers in horses" Pferdeheilkunde. Sonderausgabe 1° Europ. Konf. ü die Ernährung des Pferdes. Hannover, 34 Sept., 188-191
- 8) Dahme E. (1970) - Blutgefäße. In Joest E.: Handbuch der Speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere. B II, pag. 293, Parey, Berlin
- 9) Damodaran S., Sundararaj A. - "Epidermoid carcinoma in the stomach of a horse". Indian Vet. J. 1973, 50: 2.197
- 10) Dart A.J., Hutchins D.R., Begg A.P. - "Suppurative splenitis and peritonitis in a horse after gastric ulceration caused by larvae of *Gasterophilus intestinalis*". Austr. Vet. J. 1987, 64: 5, 155-158

- 11) Drommer W. - "*Kreislauforgane*". In: Schultz L.-Cl., Pathologie der Haustiere. Fischer Verlag, Jena, 1991
- 12) Edens L.M., Murray M.J. - "*Gastro-esophageal reflux in a weaning filly: association with Gasterophilus spp. Infestation*". Equine Vet. J. 1992, Suppl. 13, 26-28
- 13) Estes P.C., Cheville N.F. - "*The ultrastructure of vascular lesions in equine viral arteriitis*". Amer. J. Pathol. 58: 235, 1970
- 14) Furr M., Taylor L., Kronfeld D. - "*The effects of exercise training on serum gastrin responses in the horse*". Cornell Vet. 1994, 84: 1, 41-45
- 15) Guizzardi F. - "*Stomach bots of the horse: statistical studies and slaughter findings*". Arch. Vet. Ital. 1982, 33: 1/2, 28-30
- 16) Hammond C.J., Mason D.K., Watkins K.L. - "*Gastric ulceration in mature Thoroughbred horses*". Equine Vet. J. 1986, 18: 4, 284-287
- 17) Hammond C.J. - "*A study of gastric mucosal pH and its correlation with gastric ulcers in adult horses*". J. Equine Vet. Sci. 1990, 10: 6, 404-408
- 18) Hertsch B., Eidt E. - "*Clinical diagnosis of gastric carcinoma in the horse*". D.T.W. 1976, 83: 3, 92-96
- 19) Hobmaier M. (1922, 1928), cit. Da Dahme E., 1970
- 20) Hsu S., Raine L., Fanger H. - "*Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures*". J. Histochem. Cytochem. 29: 577-580, 1981
- 21) Hutyra F., Marek J., Manninger R., Moscsj J. - "*Spezielle Pathologie und Therapie der Haustiere*". Vol. II, Fischer Verlag, Jena, 1954
- 22) Joest E. - "*Spezielle pathologische Anatomie der Haustiere*". Vol. I, Schoetz, Berlin, 1919
- 23) Jubb K.V.F., Kennedy P.C. - "*Pathology of domestic animals*". Academic Press, New York, 1963
- 24) Kikuchi K. - "*Über die Altersveränderungen am Gehirn des Pferdes*". Arch. Tierheilkunde 58: 541, 1928
- 25) Kitt Th. (1905) - "*Lehrbuch der pathologischen Anatomie der Haustiere*". 3. Auflage. Band I. Enke Ver., Stuttgart.
- 26) Krahnert R. - "*Zum Magenkrebs des Pferdes*". Monatsh. Vet. Med. 7: 399, 1952
- 27) Krause C. - "*Pathologie der Blutgefäße der Tiere*". Erg. Allg. Path. u. path. Anat. 22: 350, 1927
- 28) Leinati L. (1944) - "*Compendio di Anatomia Patologica degli animali domestici*". CEA, Milano
- 29) Lindt S. (1970) - "*Magen*". In: Joest E. - Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere. 3. Auflage. Band V.
- 30) Lyons E.T., Drudge J.H., Tolliver S.C. - "*Prevalence of some internal parasites found (1971-1989) in horses born on a farm in Central Kentucky*". J. Equine Vet. Sci. 1990, 10: 2, 99-107
- 31) Marcato P.S. (1974) - Patologia sistematica veterinaria. Edagricole, Bologna.
- 32) Marcato P.S. - "*La calcificazione stellata dell'intima arteriosa del cavallo*". Atti SISVet. 36: 103, 1982
- 33) Marcato P.S., Simoni P., Galeotti M. - "*Ricerche sulla calcificazione stellata dell'intima arteriosa del cavallo*". La Clin. Vet. 106: 247-253, 1983

- 34) Marek J. - "*Dier Akute Magenerweiterung des Pferdes und ihre Behandlung*". Z. Tiermed. 1908:11, 282
- 35) Mazzi V. - "*Manuale di tecniche istologiche ed istochimiche*". Piccin, Padova, 1977
- 36) Mcagher D.M., Wheat J.D., Tennant B., Osburn B.I. - "*Squamous cell carcinoma of the equine stomach*". J.A.V.M.A. 1974, 164: 1, 81-84
- 37) Meyer B. - "*Abnorm grosser Magen bei einem Pferd*". Zbl. Fleisch Milch-Hyg. 48:169, 1938
- 38) Miller S. (1983) - "*Squamous cell carcinoma in the stomach of a pony with hypercalcaemia*". Vet. Med. Small Anim. Clin., 78(12): 1891-1893
- 39) Monari D., Marcato A., Montoni L. (1949) - "*Anatomia patologica degli animali domestici*". Patron Ed., Bologna
- 40) Montali R.J., Strandberg J.D., Squire R.A. - "*A histochemical and ultrastructural study of intimal bodies of horse arterioles*". Lab. Invest. 23: 302, 1970
- 41) Moore J.N., Kintner L.D. - "*Recurrent esophageal obstruction due to squamous cell carcinoma in a horse*". Cornell Vet. 1976, 66: 4, 590-597
- 42) Murray M.J. - "*Endoscopic appearance of gastric lesions in foals: 94 cases (1987-1988)*" - J.A.V.M.A. 1989,195: 8,1135-1141
- 43) Murray M.J., Grodinsky C., Cowles R.R., Hawkins W.L., Forfa R.J., Luba N.K. - "*Endoscopic evaluation of changes in gastric lesions of Thoroughbred foals*". J.A.V.M.A. 1990, 196: 10, 1623-1627
- 44) Nairn C. - "*Esophageal obstruction associated with squamous cell carcinoma of the equine stomach*". Ippologia 1990, 1: 4, 21-26
- 45) Nappert G., Vrins A., Larybyere M. - "*Gastroduodenal ulceration in foals*". Ippologia 1989, 1(4): 21-26
- 46) Neumann-Kleinpaul K. & Schutzler G. - "*Untersuchungen über Durchmesser, Ruptur, Fassungsvermögen und Gewicht am Magen des Pferdes*". Arch. wiss. prakt. Tierheilk. 75, 370-386
- 47) Nieberle K., Cohrs P. - "*Lehrbuch der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere*". 4te Aufl., Fischer Ver., Jena, 1961
- 48) Olson S.N. - "*Squamous cell carcinoma of the equine stomach: a report of five cases*". Vet. Rec. 1992,131: 8, 170-173
- 49) Pallaske G. und Schmidel E. - "*Pathologisch-histologische Technik*". Paul Parey, Berlin, 1959
- 50) Pass D.A., Bolton J.R. - "*Chronic eosinophilic gastroenteritis in the horse*". Vet. Pathol. 1982, 19: 5, 486-496
- 51) Pelle L. - "*Seven cases of squamous cell carcinoma of the stomach in horses*". Dansk Veterinær Tidsskrift 1988, 71: 15, 800-804
- 52) Principato M., Piorgili-Fioretti D., Moretti A. - "*Distribution and prevalence of Gasterophilus spp. in horses in Umbria*". Atti SISVet. 1984, 38: 744-748
- 53) Principato M., Fioretti D.P., Galeota L., Piorgili-Fioretti D. "*Gasterophilus pecorum (Fabricius, 1974) and Gasterophilus inermis Brauer, 1958 (Diptera: Gasterophilidae) in horses in Umbria*". Atti SISVet. 1985, 39: 2, 761-765
- 54) Principato M. - "*Classification of the main macroscopic lesions produced by the larvae of Gasterophilus spp. (Diptera: Gasterophilidae) in free-ranging horses in Umbria*". Cornell Vet. 1988, 78: 1, 43-52

- 55) Principato M. - "*Observation on the occurrence of five species of Gasterophilus larvae in free-ranging horse in Umbria, central Italy*". Vet. Parasitol. 1989, 31: 2, 173-177
- 56) Principato M. - "*Gasterophilus pecorum (Diptera: Gasterophilidae): an infrequent cause of massive gastric myiasis in the horse*". Bull. Soc. Franc. Parasit. 1990, 8: 2, 301-310
- 57) Roberts M.C. - "*Gastric lesions and gastric ulceration in foals*". Equine Vet. J. 1990, 22: 1, 2-4
- 58) Robinson W.F. e Maxie M.G. - "*The Cardiovascular System*". In: Jubb *et al.*, 1993
- 59) Schoon A., Ritcher J., Deegen E. - "*Squamous cell carcinoma in the stomach of a horse*". D.T.W. 1984, 91: 10, 374-375
- 60) Shefstad D.K. - "*Scanning electron microscopy of Gasterophilus intestinalis lesions of the equine stomach*". J.A.V.M.A. 1978, 172: 3, 310-313
- 61) Smith H.A. e Jones T.E. (1957) - "*Veterinary Pathology*". Lea & Febiger, Philadelphia.
- 62) Stoddard E.D., Fulharty G. - "*Verminous gastric tumor due to Habronema megastoma. A case report*". Flo. Vet. J. 1980, 9: 1, 14
- 63) Sweeney H.J. - "*The prevalence and pathogenicity of Gasterophilus intestinalis larvae in horses in Ireland*". Irish Vet. J. 1990, 43: 3, 67-73
- 64) Tar-Borg H. - "*Chronische Magdilatatie by een paard*". Tijdschr. Diergeneesk. 68: 672-675, 1941
- 65) Tennant B., Keirn D.R., White K.K., Bentinck-Smith J., King J.M. "*Six cases of squamous cell carcinoma of the stomach of the horse*". Equine Vet. J. 1982, 14: 3, 238-243
- 66) Traub-Dagatz J., Bayly W., Riggs M., Thomas N., Pankowski R. "*Exsanguination due to gastric ulceration in a foal*". J.A.V.M.A. 1985, 186: 3, 280-281
- 67) Wester P.W. - "*Squamous cell carcinoma in the equine stomach*". Vet. Pathol. 1980, 17: 5, 654
- 68) Wester P.W., Franken P., Hani H.J. - "*Squamous cell carcinoma of the equine stomach. A report of seven cases*". Vet. Quart. 1980, 2: 2, 95-103
- 69) Wilkie J.S.N., Yager J.A., Nation P.N., Clark E.G., Townsend H.G.G., Baird J.D. - "*Chronic eosinophilic dermatitis: a manifestation of a multisystemic, eosinophilic, epitheliotropic disease in five horses*". Vet. Pathol. 1985, 22: 4, 297-305
- 70) Wolf, 1985 - "*Magenruptur beim Pferde*". Ber. Vet-Wes. Konigr. Sachsen 40. 158-159
- 71) Yoshihara T., Kaneko M., Oikawa M., Kanemaru T., Hasegawa M., Tomioka Y. - "*Pathological findings in cases of gastric ulcer in the proventricular region of foals*". Bull. Equine Res. Inst. 1986, 23: 7-13
- 72) Zakopal J. And Husàk S. - "*Ein perforierendere Fremdkörper im Magen eines Pferdes*". Veterinarstvi, 13, 473-474, 1963

# INDAGINE RETROSPETTIVA (1988-1994) SULLA PATOLOGIA NEOPLASTICA DEL CAVALLO

RU G. <sup>(1)</sup>, CANESE M. G. <sup>(1)</sup>, DONN A. <sup>(1)</sup>,  
RATTAZZI C. <sup>(2)</sup>, GUARDA F. <sup>(1)</sup>

(1) *Dipartimento di Patologia Animale - Torino*

(2) *Azienda Sanitaria Regione Piemonte 4, Chivasso (Torino)*

Gli obiettivi che ci siamo posti intraprendendo la presente ricerca sono stati, da un lato, di fornire un dato sulla frequenza della patologia neoplastica del cavallo raccolta presso i nostri laboratori e, dall'altro, di dare una panoramica delle lesioni neoplastiche riscontrate nell'arco dei sei anni e sei mesi di osservazione.

## *MATERIALI E METODI*

Lo studio si è incentrato su 54 neoplasie riscontrate in 53 cavalli presso la sezione di Anatomia Patologica del Dipartimento di Patologia Animale di Torino nel periodo compreso tra l'1 gennaio 1988 e il 30 giugno 1994. L'età e il sesso erano noti per 34 soggetti (63%). Gli animali avevano un'età che variava tra i 2 e i 24 anni con media 10.8 anni (DS 5,7) e mediana 10. Otto soggetti erano di sesso femminile e 26 di sesso maschile (la castrazione era indicata solo per 3 soggetti ma anche in questo caso il dato è probabilmente incompleto). Per quanto riguarda la razza di appartenenza, il gruppo di maggior consistenza era rappresentato da 13 animali di razza argentina. È stato anche determinato il numero totale dei cavalli esaminati per qualsiasi ragione nel medesimo periodo.

I tumori derivavano da esami autoptici eseguiti nella nostra sezione, da pezzi anatomici riscontrati alla visita ispettiva da veterinari operanti al macello, oppure da biopsie intraoperatorie eseguite dai colleghi della clinica del dipartimento o da veterinari liberi professionisti. I campioni prelevati erano fissati in formalina tamponata al 10 % e inclusi in paraffina. Tutte le sezioni ottenute sono state colorate con ematossilina eosina ed in alcuni casi con la reazione PAS e/o con la colorazione tricromica di Masson.

## RISULTATI

Nei sei anni e sei mesi considerati dalla presente ricerca, la prevalenza a livello biotico e necroscopico della patologia neoplastica, rispetto a tutte le altre patologie del cavallo, è risultata pari al 6,7% (53 cavalli sul totale dei 789 esaminati presso la nostra sezione).

Delle 54 neoplasie osservate, 25 (46,3%) erano di tipo maligno.

Le sedi preferenziali erano la cute (23 tumori pari al 42,6% del totale), gli organi genitali esterni maschili (7; 13%), le palpebre e le altre strutture esterne dell'occhio (5; 9,3%), la tiroide (3; 5,6%), seguite da ipofisi, rene e fegato (2 tumori, 3,7%, per ciascuno di essi).

I tipi tumorali di più frequente osservazione sono stati: papillomi (8; 14,8%), carcinomi squamocellulari (6; 11,1%), e sarcoidi (6; 11,1%). Altri tumori di riscontro relativamente comune sono stati: fibromi (3; 5,6%), fibrosarcomi (3; 5,6%), emangiomi (3; 5,6%), schwannomi (3; 5,6%) tumori melanocitari (3; 5,6%), colangiocarcinomi (2; 3,7%), carcinomi renali (2; 3,7%), carcinomi tiroidei (2; 3,7%), adenomi ipofisari (2; 3,7%) e linfomi (2; 3,7%). Infine abbiamo calcolato l'età media dei soggetti affetti dalle tre forme tumorali più frequenti che risultava di 15,7 anni (range 8-24) negli animali con papilloma, di 11,7 anni (8-20) in quelli con carcinoma squamocellulare e di 6,6 anni (4-10) nei soggetti con sarcoide.

## DISCUSSIONE

Non sono molto numerosi i dati sulla prevalenza delle neoplasie equine disponibili in letteratura. Cotchin (1977), rifacendosi anche ai risultati di precedenti ricerche, affermava che i tumori nel cavallo rappresenterebbero tra l'uno e il tre per cento di tutti i casi di interesse chirurgico. Nel nostro caso le neoplasie rappresentavano il 6,7% di tutte le lesioni osservate, un dato quindi più elevato e simile all'11% riferito da Cotchin e Baker-Smith (1975), riguardante osservazioni eseguite esclusivamente al macello, o al 17,9% riferito da Sundberg e coll. (1977) presso un laboratorio diagnostico universitario americano. Dati di questo tipo, anche se utili per confrontare differenti ricerche, devono essere valutati con cautela perché difficilmente rispecchiano la prevalenza nell'intera popolazione. Nelle indagini retrospettive, infatti, il numero di tumori viene rapportato al totale dei cavalli esaminati per qualsiasi patologia. Non si tratta quindi di campioni casuali rappresentativi dell'intera popolazione di provenienza ma al contrario di campioni fortemente se-

lezionati e nei quali le patologie inconsuete o di più difficile diagnosi (come i tumori) risultano sovrarappresentate. Inoltre confrontando i risultati dei diversi Autori, occorre prestare attenzione al tipo di fonte utilizzata: dati di frequenza ottenuti al macello comprenderanno lesioni neoplastiche (ad esempio a livello tiroideo), che in ricerche eseguite in sede clinica possono sfuggire perchè inapparenti.

In letteratura si riferisce il netto prevalere delle lesioni di tipo benigno mentre nel nostro studio il numero di lesioni benigne e maligne era simile. Probabilmente ciò non rispecchia una reale differenza ma la nostra scelta di inserire tutti i casi di sarcoide tra i tumori di tipo maligno, in accordo con la classificazione del WHO (Weiss, 1974).

Le localizzazioni preferenziali da noi osservate (cute, organi genitali maschili esterni, occhio e strutture annesse, tiroide) sono sovrapponibili allo spettro degli organi più comunemente colpiti desumibile dalla letteratura (Baker e Leyland, 1975, Cotchin, 1977, Sundberg et al., 1977, Bastianello, 1983). Abbiamo rilevato un solo caso di interessamento del cavo toracico rappresentato da un timoma a prevalente proliferazione epiteliale.

Prendendo in considerazione i tipi istologici, quelli riscontrati più frequentemente sono stati papillomi, carcinomi squamocellulari, sarcoidi, fibromi, fibrosarcomi, schwannomi, emangiomi e melanomi. Anche tale osservazione non si discosta dai risultati di ricerche simili alla nostra (Baker e Leyland, 1975, Cotchin, 1977, Sundberg et al., 1977, Bastianello, 1983). Come accennato, le differenze nelle frequenze relative sono spiegabili con il tipo di archivio consultato (cliniche, laboratori diagnostici, macelli) e quindi con la diversa provenienza dei casi.

La localizzazione preferenziale dei papillomi è a livello di cute, labbra, occhi e genitali, quella dei carcinomi squamocellulari a livello di occhi, cavo orale e seni mascellari, e genitali (Strafuss, 1976, Junge et al., 1984) e quella dei sarcoidi in aree suscettibili a traumi come testa, addome, arti (Miller e Campbell, 1982). In generale, poi, è stato rilevato che il sarcoide si trova più frequentemente in animali giovani, mentre il carcinoma squamoso prevale in animali decisamente più anziani (Sundberg 1977) e che papillomi e carcinomi squamosi presentano distribuzioni di età e di localizzazione sovrapponibili (Junge, 1984). Anche tali osservazioni hanno trovato conferma nei dati della nostra ricerca.

In conclusione, ricerche di questo tipo oltre a fornire informazioni preziose al clinico, possono servire da punto di partenza per la realizzazione di ricerche epidemiologiche tese all'identificazione dei possibili fattori di rischio,

a patto che la raccolta delle informazioni sui singoli casi sia il più possibile completa.

### RIASSUNTO

Tra il 01.01.1988 e il 30.06.1994, sono stati osservati 54 tumori in 53 dei 789 cavalli registrati nell'archivio della sezione di Anatomia Patologica del Dipartimento di Patologia animale di Torino. Il numero di lesioni maligne era simile a quello delle neoplasie benigne (rispettivamente 25 e 29). In ordine, le sedi più frequentemente interessate erano: cute (42,6%), genitali maschili esterni (13%), occhio (9,3%), tiroide (5,6%). Tra i tipi istologici tumorali, prevalevano papillomi (14,8%), carcinomi squamocellulari (11,1%) e sarcoidi (11,1%).

### BIBLIOGRAFIA

- 1) Baker J.R., Leyland A. *Histological survey of tumours of the horse, with particular reference to those of the skin*. Vet. Rec., 1975, 96, 419-422.
- 2) Bastianello S.S. *A survey on neoplasia in domestic species over a 40-year period from 1935 to 1974 in the republic of south Africa*. IV. Tumours occurring in Equidae. Onderstepoort J. vet. Res., 1983, 50, 91-96.
- 3) Cotchin E. *A general Survey of tumours in the horse*. Equine vet. J., 1977, 9(1), 16-21.
- 4) Cotchin E., Baker-Smith J. *Tumours in horses encountered in an abattoir survey*. Vet. Rec., 1975, 97, 339.
- 5) Junge R. E., Sundberg J. P., Lancaster W. D. *Papillomas and squamous cell carcinomas of horses*. JAVMA, 1984, 185(6), 656-659.
- 6) Miller R.I., Campbell R.S.F. *A survey of granulomatous and neoplastic diseases of equine skin in north Queensland*. Austr. Vet. J., 1982, 59, 33-37.
- 7) Straffuss A.C. *Squamous cell carcinoma in horses*. JAVMA, 1976, 168, 61-62.
- 8) Sundberg J.P., Burnstein T., Page E.H., Kirkham W.W., Robinson F.R. *Neoplasms of Equidae*. JAVMA, 1977, 170, 150-152.
- 9) Weiss E. *Tumours of the soft (mesenchymal tissues)*. WHO, 1974, 50, 101-110.

# STUDIO ISTOCCHIMICO, IMMUNOISTOCCHIMICO ED ULTRASTRUTTURALE DI UN ADENOMA PSEUDOCROMOFOBO IPOFISARIO (Silent "Corticotroph" Adenoma subtype 2) DELLA *pars intermedia* IN UN CAVALLO<sup>1</sup>

ROSSI G., NARDINI V\*., VITALI C.G., TACCINI E., CANTILE C.,  
BRACA G., RENZONI G.

*Dipartimento di Patologia Animale Profilassi ed Igiene degli Alimenti, Pisa.*

*(\*) Istituto di Anatomia Patologica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Pisa.*

## INTRODUZIONE

Nel cavallo sono descritti in letteratura reperti di neoplasie a carico dell'ipofisi ed in particolare viene sottolineata la maggior prevalenza dell'adenoma della *pars intermedia*.

Comunque, ritenendo ancora attuali le stime fatte negli anni settanta (1) secondo le quali la frequenza di questo tumore nei cavalli oscilla dallo 0,06% allo 0,12%, le neoplasie ipofisarie appaiono infrequenti.

Dal punto di vista clinico le neoplasie ipofisarie condizionano tre possibili evenienze derivanti da una alterazione morfologica e strutturale del parenchima ghiandolare ovvero: a) fenomeni di ipopituitarismo legati ad una compressione e conseguente atrofia della parte di parenchima rispettato e normalmente secernente; b) fenomeni di ipersecrezione di talune molecole ormonali; c) nessuna manifestazione quando si tratti di neoplasie poco o nulla secernenti e di limitata invasività (silent tumor).

Di particolare interesse e fonte di discussione è a tutt'oggi il problema classificativo di queste neoplasie.

## MATERIALI E METODI

Un cavallo trotatore Belga maschio, castrone di anni 15, è stato soppresso a seguito di una serie di gravi manifestazioni cliniche, di natura neurologica, succedutesi nell'ultimo mese di vita. Dall'anamnesi prossima si è rilevata una epistassi ricorrente, cambiamento di indole, leggera poliuria e

---

1) Ricerche condotte con contributo MURST 40% anno 1993.

polidipsia (legate ad una forma nefritica progressiva), perdita di sensibilità del piano naso-labiale sinistro con apparente cecità monolaterale sullo stesso lato. Nell'ultima settimana di vita è stato inoltre descritto un comportamento aggressivo del soggetto (tentativi di rampare), una difficoltà nel bere ed una certa dismetria del passo sul bipede laterale sinistro durante la deambulazione. Si è rilevata anche una ipoestesia a livello del tronco peraltro limitata al lato sinistro.

L'ipofisi è stata prelevata in toto, fissata in formalina tamponata (pH 7,4) ed inclusa in paraffina per le indagini istomorfologiche (con le seguenti colorazioni: ematossina-cosina (E.E.), PAS, Rasmussen-Ignesti, Gabe modificata, Van Gieson) ed immunistochemiche (testando le sezioni per i seguenti antigeni: LH, FSH, TSH, GH, LTH, ACTH ed NSE) secondo il metodo Avidina-Biotina-Perossidasi, facendo uso della Diaminobenzidina (DAB) quale substrato cromogeno ed usando come controllo sezioni di ipofisi prelevate da un puledro di 8 mesi, morto per cause accidentali. Gli anticorpi utilizzati sono stati: rabbit anti ACTH (policlonale sintetico umano ACTH 1-24, diluito 1:300, Dako lotto n.o.040), anti-LTH (policlonale diluito 1:300), anti-FSH (policlonale diluito 1:200), anti-TSH (PLC diluito 1:800), anti-NSE (MCL diluito 1:100). Il Kit ABC-Perossidasi utilizzato è il Vectastain elite (Vector-Burlingame USA). In ogni prova sono stati allestiti preparati di controllo in cui è stato ommesso il trattamento con l'anticorpo (Ab) primario, che sono risultati sempre negativi nella fase successiva di sviluppo della reazione con la DAB.

Alcuni frammenti di tessuto prelevati nella zona rispettata, neoplastica e intermedia, sono stati inclusi in epon-araldite ed osservati al microscopio elettronico.

## RISULTATI

### *Reperti necroscopici*

Alla necroscopia non si evidenziavano macroscopicamente lesioni agli organi target degli ormoni ipofisari; anche gli altri distretti organici erano nella norma, fatta salva la presenza di alcuni focolai di fibrosi a carico di entrambi i reni e di fenomeni flogistici focali a carico dell'encefalo, di natura sicuramente parassitaria. L'asportazione dell'ipofisi dalla sua sede anatomica tramite resezione del diaframma della sella, permetteva di evidenziare un leggero aumento del volume complessivo della ghiandola. Sezionata sul piano sagittale mediano, la ghiandola presentava centralmente una zona circolare, di colore rossastro e di diametro di un centimetro circa. La

neoformazione era nettamente distinguibile dalla *pars distalis* (lobo anteriore) dell'adenoipofisi che si estendeva in zona rostro-ventrale rispetto al nodulo. In seno alla neoformazione si poteva osservare una piccola area iperemico-emorragica a margini irregolari, di circa 2-3 millimetri di diametro localizzata ventro-caudalmente in seno al nodulo. La *pars nervosa* era, almeno macroscopicamente, rispettata.

#### *Reperti microscopici*

Una prima osservazione microscopica di sezioni colorate con E.E., mostrava la natura neoplastica benigna del nodulo intraipofisario. Nel complesso la massa risultava costituita da cordoni di cellule cilindriche o poligonali, con nucleo ovale relativamente grande e mediamente cromatico, che assumevano un aspetto a "nido" intorno alle strutture vascolari. La neoplasia risultava inoltre marginata rostro-ventralmente da un'esile pseudo-capsula connettivale (evidenziata molto bene dalla colorazione di Van Gieson) che la divideva dal lobo anteriore. Dorsalmente la massa sembrava confluire in alcuni punti nella *pars intermedia* residua; la parte nervosa appariva invece rispettata. Una esile rete di natura connettivale, con origine dalla capsula, si irradiava all'interno della massa e, insieme ai numerosi capillari, che per il diametro incostante e le numerose lacune formate assumevano l'aspetto di veri e propri sinusoidi, costituiva l'impalcatura su cui poggiavano le cellule neoplastiche. Lacune ematiche di maggiori dimensioni, riccamente infarcite di emazie, si osservavano ventro-caudalmente in seno all'area neoplastica.

Le cellule di forma quasi cilindrica e di dimensioni simili tra loro presentavano il rapporto nucleo/citoplasma costante (1:3 circa). I nuclei erano moderatamente basofili e a cromatina marginata; le figure mitotiche erano quasi assenti. Solo sporadiche cellule manifestavano una leggera eosinofilia del citoplasma ed una PAS positività della fine granulazione citoplasmatica, non comparabile con quella delle popolazioni cellulari basofile della *pars distalis*.

#### *Istochimica*

Mentre la colorazione con E.E. evidenziava, a fianco di una netta differenziazione tra elementi cellulari eosinofili ed elementi basofili presenti nella *pars distalis*, una lieve colorazione delle cellule neoplastiche, con il metodo Rasmussen-Ignesti si poteva osservare una netta distinzione tra le cellule acidofile, colorate in rosso brillante, e quelle basofile, colorate in azzurro cupo, della *pars distalis*. Le cellule in stadio di esaurimento funzio-

nale della *pars distalis* e quelle della neoplasia erano colorate appena in rosa pallido mostrando il loro aspetto cromofobo. Medesimi risultati si sono ottenuti con la colorazione di Gabe (metodo modificato). In questo caso le cellule del lobo anteriore sono state ben differenziate mentre le cellule dell'adenoma non hanno sviluppato nessuna reazione tintoriale specifica.

### *Immunoistochimica*

Le prove immunoistochimiche sono state condotte utilizzando un pannello anticorpale comprendente i sei ormoni ipofisari, ed un antigene marker delle cellule nervose. I risultati delle prove immunoistochimiche sono di seguito sintetizzati in tabella.

Markers	FSH	LH	LTH	STH	TSH	ACTH	NSE
cellule tumorali	-	-	-	-	-	+/-	-
cellule orangiofile	-	-	+	-	-	-	-
cellule alfa	-	-	-	+	-	+++	-
cellule beta	-	-	-	-	+	-	-
cellule gamma	++	+++	-	-	-	-	-
pars nervosa	-	-	-	-	-	-	++
pars intermedia	-	-	-	-	-	++	-
follicoli colloide	-	-	-	-	-	+	-

Legenda: FSH = ormone follicolo stimolante, LH = o. luteinizante, LTH = o. luteotropo o prolattina, STH = o. somatotropo, TSH = o. tireotropo, ACTH = o. corticotropo, NSE = enolasi neuronale specifica.

Come si evince dalla stessa, le cellule tumorali non reagivano con nessun anticorpo, eccezion fatta per una debole ma diffusa ed uniforme positività espressa costantemente dalle cellule tumorali per l'Ab anti ACTH 1-24. Tale positività assumeva caratteri leggermente più marcati soltanto in cellule neoplastiche sporadiche ed isolate; ad un maggiore ingrandimento si notava una marcatura a ridosso della membrana citoplasmatica come osservato anche da Boujon et al (5).

### *Ultrastruttura*

Le cellule neoplastiche si differenziavano nettamente sia dalle cellule del lobo anteriore dell'adenoipofisi, caratterizzate dall'aver un citoplasma ricco di granuli di secreto, a core più o meno elettrondenso delimitati da membrana, ora sparsi in maniera uniforme nel citoplasma (cellule somatotrope),

ora raccolti in prossimità di un polo della cellula (cellule ad LH) ora di dimensioni piuttosto ridotte (cellule a TSH) oppure polimorfi (cellule a LTH), sia da quelle della *pars intermedia*, abbastanza piccole, con nucleo irregolare, pochi mitocondri e numerosi granuli moderatamente elettrondensi. L'adenoma risultava infatti costituito da cellule per lo più di grandi dimensioni con nucleo indentato, citoplasma ricco di piccoli mitocondri di forma per lo più sferica e talora recanti anomalie soprattutto alle creste; pochi granuli moderatamente elettrondensi di dimensioni variabili, reticolo endoplasmatico rugoso (R.E.R.) poco rappresentato così come l'apparato del Golgi. Il nucleo delle cellule neoplastiche presentava uno o più nucleoli non prominenti con cromatina addensata in prossimità della membrana nucleare. Molto raro era il reperto di alcune cellule di dimensioni ridotte e con citoplasma ripieno di granuli fortemente elettrondensi.

### DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'applicazione delle metodiche immunoistochimiche (17) ed ultrastrutturali (8) è fondamentale per la formulazione di una corretta diagnosi delle neoplasie ipofisarie. E' infatti grazie all'utilizzo di queste tecniche che è stato possibile rivedere la vecchia classificazione in tumori basofili, acidofili e cromofobi in quanto molto riduttiva perchè basata essenzialmente su osservazioni di natura istochimica. E' noto infatti che molti casi di adenoma a cellule prolattiniche, un tempo ascritti agli adenomi cromofobi per la loro pressochè totale negatività alle più comuni colorazioni istochimiche (10, 16), vengono oggi inseriti tra gli adenomi acidofili; lo stesso dicasi per molti adenomi a cellule corticotrope (11). L'adenoma francamente cromofobo che un tempo era considerato il tipo di neoplasia ipofisaria più comune, sembra addirittura non esistere o, secondo alcuni Autori, essere rappresentato esclusivamente dai cosiddetti "null cell adenoma" o adenomi fetali (18), molto rari e caratterizzati da cellule povere di granuli di secreto o totalmente prive e povere di organuli cellulari. Accanto ai classici adenomi acidofili e basofili è più corretto quindi parlare di adenomi ipofisari pseudocromofobi per indicare quei tumori che all'istochimica presentano cellule con modesta affinità tintoriale. Il tumore da noi studiato può quindi essere inquadrato tra gli adenomi pseudocromofobi secondo la classificazione di Lanza (13) o tra gli adenomi cromofobi non secernenti secondo la classificazione di Capen (6, 7) e Zaki (19). Per la classificazione di questa neoplasia abbiamo utilizzato i criteri della patologia umana dato che in veterinaria tale classificazione è molto meno dettagliata, non comprendendo una

grande varietà di sottotipi nell'ambito della stessa neoplasia.

Secondo la classificazione di Moulton (14) e secondo quella più recente di Capen (7), che privilegia la sede di insorgenza del tumore piuttosto che la sua morfologia cellulare, l'adenoma rientra semplicemente negli adenomi della *pars intermedia*. Secondo la morfologia cellulare ed il comportamento della neoplasia, atipico rispetto alle caratteristiche ultrastrutturali individuabili nell'adenoma della *pars intermedia* - assenza quasi totale di granuli di secreto, ricchezza in mitocondri, sviluppo limitato del R.E.R e dell'apparato di Golgi nonché totale assenza dei segni clinici regolarmente descritti in associazione a questo tipo di adenoma (9, 4, 2, 11, 3, 15) - ci è sembrato più corretto applicare la classificazione utilizzata in patologia umana da Lanza (13) e Kovacs e Horvath (11), basata essenzialmente sulla individuazione degli aspetti citomorfofunzionali degli elementi cellulari costituenti la neoplasia. In base a questa classificazione l'adenoma rientrerebbe tra gli adenomi pseudocromofobi o adenomi corticotropi.

All'esame ultrastrutturale l'adenoma da noi studiato è risultato morfologicamente riconducibile al "*silent corticotroph adenoma subtype 2*" in accordo con quanto descritto da Kovacs e Horvath (1). Anche nel nostro caso abbiamo osservato la presenza di clusters di cellule immature paragonabili a quelle rinvenibili nel "*null cell adenoma*". Il reperto indica un alto grado di immaturità delle cellule neoplastiche nelle quali si possono reperire sporadici granuli di secreto e numerosi mitocondri, caratterizzati da un certo polimorfismo e da fenomeni alterativi a livello delle creste. Questi aspetti ultrastrutturali ricordano la struttura tipica dell'adenoma non secernente di tipo oncocitario, come descritto da Landolt e Oswald (12). Gli sporadici granuli di secreto osservati al M.E. sono risultati essere di natura peptidica e, con molte probabilità ACTH simile; si presuppone in ogni caso che si tratti di granuli contenenti peptidi derivati dalla Proopiomelanocortina (POLMC), data la loro reattività agli anticorpi anti ACTH (catena 1-24 che, secondo Kovacs e Horvath (11) ha una bassa specificità di reazione se paragonato all'Ab che riconosce la catena 1-39 o 17-39 dell'ACTH, interagendo con la prima frazione di quasi tutti i POLMC derivati).

L'immunoistochimica ha poi confermato questi reperti ultrastrutturali in quanto la neoplasia ha espresso una debole ma uniforme positività al siero anti ACTH. Una positività debole ed uniforme per l'anticorpo anti ACTH è stata espressa anche dalla *pars intermedia* dell'ipofisi; tale positività è legata alla cross-reattività dell'Ab anti ACTH con le molecole polipeptidiche

POLMC-derivate le quali presentano alcune sequenze aminoacidiche identiche. Nella maggior parte dei cavalli infatti la *pars intermedia* ed, in misura minore, alcune aree della *pars distalis* producono la molecola-precursore POLMC che reagisce in maniera aspecifica con Ab specifici verso molti peptidi quali l'ACTH, l' $\alpha$ ,  $\beta$  o  $\gamma$ , MSH, la  $\beta$ LPH, il CLIP (Peptide Corticotropin Simile della Parte Intermedia), molecole tutte da essa derivate dopo fenomeni di clivaggio.

La presenza dell'adenoma pseudocromofobo a cellule ACTH secernenti della *pars Intermedia*, nel nostro caso non ha prodotto alcuna sintomatologia clinica riferibile ad un quadro di PDH (Pituitary Dependent Hyperadrenocorticism), differente dalla malattia di Cushing, frequentemente descritta nel cane come più diretta conseguenza di adenoma cromofobo pituitario. Ciò è da ritenersi correlato alle ridotte dimensioni dell'adenoma (appena un cm. di diametro) ed all'esiguo numero di cellule effettivamente secernenti in esso presenti.

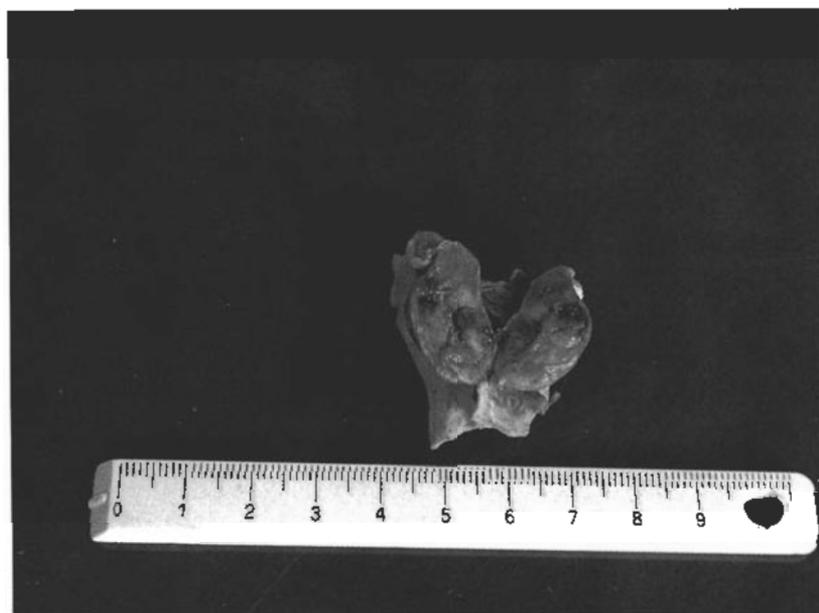


Fig. 1 - Ipofisi. La lesione neoplastica appare come formazione rotondeggiante, con area discromica emorragica, senza marcate modificazioni di volume della ghiandola.

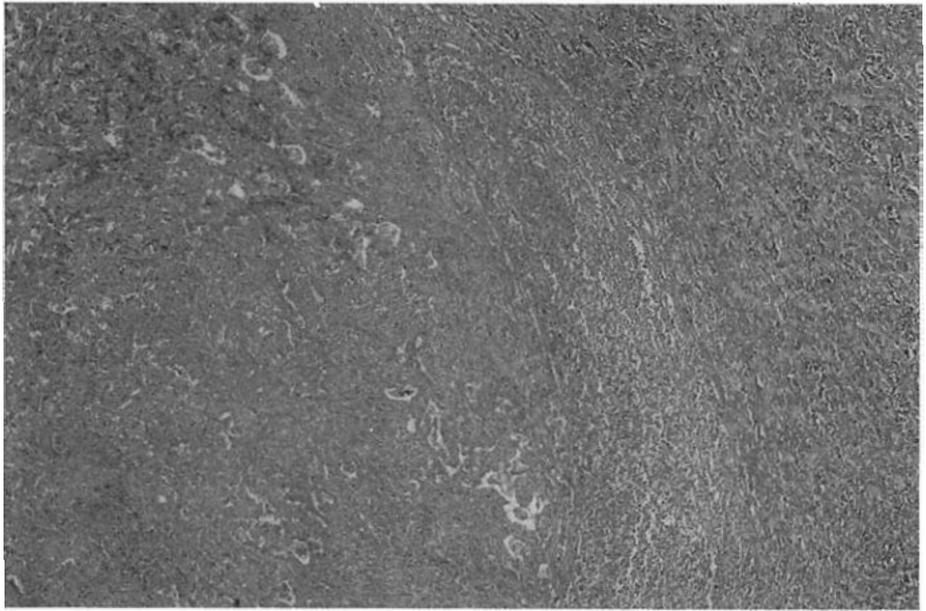


Fig. 2 - Ipofisi. Coloraz. E-E. Piccoli ingrandimenti. E' documentata la netta delimitazione tra massa neoplastica, in cui si evidenzia un apparente quadro emorragico, e la parte del tessuto rispettato.

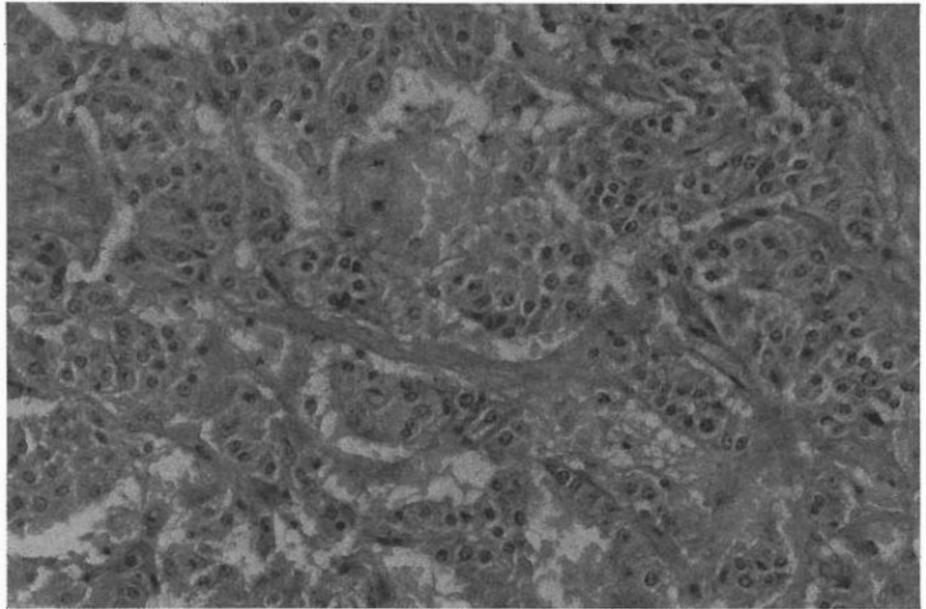


Fig. 3 - Ipofisi. Coloraz. E-E. Forti ingrandimenti. L'organizzazione tumorale appare di tipo lobulare con delicata ma evidente trama connettivale. Inoltre si apprezza il fenomeno di replezione ematica in strutture sinusoidi ed in formazioni lacunari angioectasiche o francamente emorragiche.

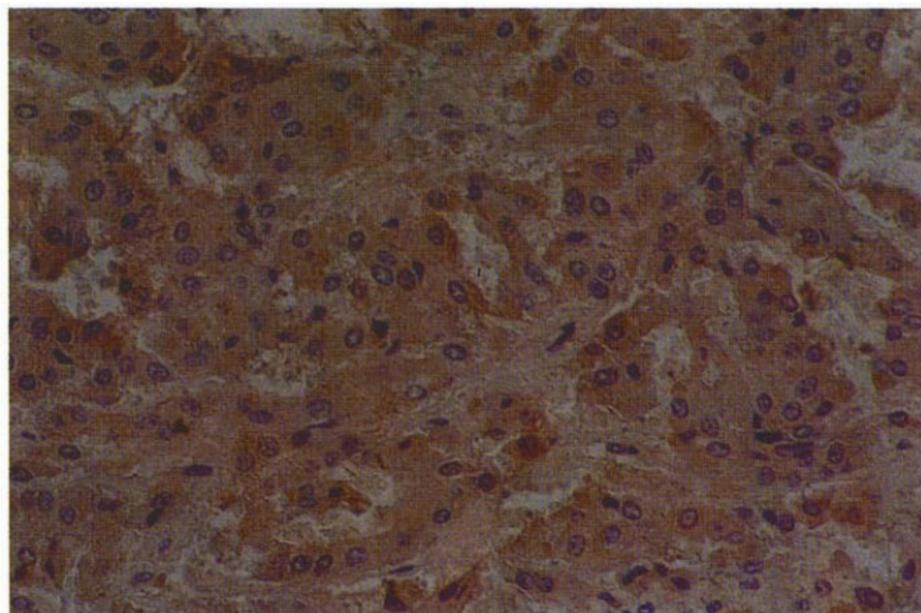


Fig. 4 - Ipofisi. Immunoreazione ABC-Perossidasi, substrato DAB, colorazione nucleare con Ematossilina di Harris. Forti ingrandimenti. La reazione immunocistochemica evidenzia una debole positività in gran parte delle cellule tumorali mentre alcune reagiscono più intensamente all'anticorpo per ACTH.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Auer D.E., Wilson R.G., Groenedyk S., Filippich I.J. (1987). *Glucose metabolism in a pony mare with a tumor of the pituitary gland pars intermedia*. Australian Vet. Jour., 64, no. 12, 379-382.
- 2) Bestetti G.F., Abramo F., Guillaume-Gentil C., Rohner-Jeanrenaud F., Rossi G.L. (1990). *Changes in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis of genetically obese fava rats: a structural, immunocytochemical, and morphometrical study*. Endocrinology 123, 1880-1887.
- 3) Boly H., Humbolt P., Tillet Y., Thibier M. (1994). *Effects of Trypanosoma congolense infection on the pituitary gland of Baulé bulls: immunohistochemistry of LH- and FSH-secreting cells and response of plasma LH and testosterone to combined dexamethasone and GnRH treatment*. J. of Reproduction and Fertility: 100, 157-162.
- 4) Boujon C.E., Ritz U., Rossi G.L., Bestetti G.E. (1991). *A clinico-pathological study of canine Cushing's disease caused by a pituitary carcinoma*: J. Comp. Pathol: 105, 353-364.
- 5) Boujon C.E., Bestetti G.E., Meier H.P., Straub R., Junker U., Rossi G.L. (1993). *Equine pituitary adenoma: a functional and morphological study*. J. Comp. Pathol, 109, 163-178.

- 6) Capen C.C., Martin, S.I. et al. (1976). *A neoplasm in the adenohypophysis of dogs: a clinical and pathologica study*. Path. Vet. 4, 301-325
- 7) Capen C.C., *The endocrine glands*: in Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N, eds Pathology of domestic animals. Orlando, Fla Academic Press Inc. (1993); pagg.272-285.
- 8) Ghadially F.N. in: *Diagnostic electron microscopy of tumors*; II° ed. Butterworth Tsh & Co. (Publishers LTD 1985)
- 9) Horvath C.J., Ames T.R., Metz A.L., Larson V.J., (1988). *Adrenocorticotropin-containing neoplastic cells in a pars intermedia adenoma in a horse*: JAVMA, 192, 3, 367-371
- 10) Kovacs K., Coremlum B., Sierek A.M.T., Pcnz G., Ezrin C. (1976). *Localization of prolactin in chromophobe pituitary adenomas; study of human necropsy material by immunoperoxidase technique*. J. Clin. Pathol. 29; 250-258.
- 11) Kovacs K. and Horvath E.: *Tumors of the Pituitary Gland*. Armed forces institute of Pathology, Washington (1983)
- 12) Landolt A.N., Oswald U.W., (1973). *Histology and ultrastructure of an oncocytic adenoma of the human pituitary*. Cancer 31, 1099-1105, 1973.
- 13) Lanza G.: *Istopatologia dei tumori*; Piccin Editore Padova, 1980.
- 14) Moulton J.E.: *Tumors in Domestic animals*; second edition (1978). University of California press. Edit by Jack E. Moulton.
- 15) Peterson M.E., Krieger D.T., Drucker W.D., Halmi N.S. (1982). *Immunocytochemical study of the hypophysis in 25 dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism*. Acta Endocrinologica, 101, 15-24.
- 16) Robert F., Hardy J. (1975). *Prolattin-secreting Adenomas*. Arch. Path. Lab. Med 99, 625-633.
- 17) Scheithauer B.W. (1988). *Monoclonal antibodies in diagnostic Immunohistochemistry*. Siegal Eds, Dekker Inc., NewYork, Basel, 413-454.
- 18) Solcia E., Capella C., Buffa R., Frigerio B., Fontana B., Usellini L. (1977). *Tumori della Ipofisi: diagnosi morfologica e classificazione*. Pathologica 69, 333-346.
- 19) Zaki F.A., Liu S.K. (1973). *Pituitary chromophobe Adenoma in a cat*. Vet. Path. 10, 232-237.

## **PATOLOGIA INFETTIVA: BRUCELLOSI E LEPTOSPIROSI**

FARINA R.

*Dipartimento di Patologia Animale, Pisa*

Tra le cause infettive incidenti sulla riproduzione degli ovi-caprini le brucelle occupano un posto di assoluta preminenza. Per la sua capacità di provocare aborto e di localizzare in organi genitali maschili inducendovi lesioni in grado di compromettere la fecondità dei riproduttori, *Br. melitensis* gioca - com'è noto - un ruolo fondamentale. I problemi di ordine epidemiologico, patogenetico, diagnostico e profilattico connessi con questo tipo di infezione sono perfettamente conosciuti da tutti voi, per cui ritengo superfluo insistervi ulteriormente in questa sede.

Penso sia invece utile che io richiami la vostra attenzione sulla cosiddetta "epididimite dei montoni" la cui presenza in Italia è stata recentissimamente accertata in greggi di ovini bergamaschi con il ripetuto isolamento dell'agente causale, *Br. ovis*.

### Epididimite dei montoni

Si tratta di una entità morbosa attualmente diffusa in molti paesi di quattro continenti (solo l'Asia ne risulta indenne). In Europa esiste allo stato endemico sia in paesi dell'Est (CSI, Romania, Repubblica Ceca, Slovacchia e Polonia) che in paesi dell'Occidente (Francia, Spagna, Germania e Svizzera).

In un gregge colpito le manifestazioni ed i fenomeni patologici di maggiore significato sono essenzialmente rappresentati da sensibile riduzione del numero delle gravidanze e quindi delle nascite per ipofecondità degli arieti e secondariamente da perdita di prodotti del concepimento per aborto, incremento della quota di agnelli sottopeso alla nascita, aumento dei casi di mortalità perinatale.

Il contagio diffonde nella maggioranza dei casi da maschio infetto a maschio sano attraverso l'accoppiamento, nel corso di un ciclo estrale, con la stessa femmina. Talvolta pecore infettate per via venerea da arieti con epididimite presentano una cervico-vaginite che di solito guarisce in pochi giorni, ma che può ricomparire in occasione dell'estro successivo. In tal

modo questi animali fungono da riserve di infezione, che sono poi capaci di trasmettere agli animali al momento del coito.

Anche i maschi impuberi sono suscettibili a *Br. ovis*; in alcune greggi essi si ritrovano portatori di lesioni epididimali e/o sono sierologicamente positivi fino all'80% dei casi. Il fatto è stato messo in relazione con la sodomia; sebbene sia dimostrato che l'infezione sperimentale indotta per via rettale è capace di riprodurre epididimite, esistono forti dubbi che questo meccanismo sia alla base di una così vasta propagazione del contagio tra maschi impuberi. Vi sono sicuramente altre modalità di trasmissione, non ancora identificate. Una eventuale trasmissione congenita sembra doversi escludere dal momento che agnelli nati da pecore infettate in gravidanza non presentano mai infezione attiva.

Sebbene *Br. ovis* passi con facilità da maschio infetto a pecora sana durante l'accoppiamento, la gravidanza -sempre che si stabilisca- evolve in questo caso fino al termine in condizioni di assoluta normalità.

L'aborto è piuttosto raro e si manifesta solo quando si ha un sufficiente accumulo di germi e si instaurano fenomeni di necrosi a livello delle caruncole placentari, il che accade solo (ma non è la regola) nel caso in cui l'infezione coincide con il secondo mese di gestazione.

Fenomeno costante è il lento progredire del processo infettivo e quindi il lungo lasso di tempo che intercorre tra il momento del contagio e l'eventuale interruzione della gravidanza. Tale lenta progressione spiega l'assai modesta frequenza dell'aborto rispetto all'elevato numero di pecore sieropositive in allevamenti infetti.

In effetti il feto può sopravvivere a lungo in utero in presenza della infezione e la prima conseguenza della stessa non è tanto l'aborto quanto una placentite che, ostacolando gli scambi nutritivi materno-fetali, provoca spesso -come già si è detto- la nascita di agnelli di scarto.

Il contagio da pecora con aborto a pecora indenne è ritenuta evenienza molto rara (alcuni la negano del tutto), così come il contagio indiretto in seguito al pascolamento su prati contaminati da pecore con aborto o parto infettante. In questi ultimi animali *Br. ovis* è presente nella secrezione utero-vaginale per non più di 10 giorni e nel latte per circa 2 settimane.

Molti ritengono che la recettività vari a seconda della razza. Gli arieti Merino, ad esempio, si infetterebbero con minore frequenza degli arieti di razze inglesi conviventi nello stesso focolaio; ugualmente le razze derivate dal Merino allevate in Spagna sembrano assai più resistenti all'infezione di altre razze europee di importazione. Sebbene la resistenza genetica alla

epididimite sia certamente importante, vi è da tener conto che la maggior suscettibilità verso *Br. ovis* può in parte dipendere da un più precoce raggiungimento della pubertà e quindi dell'attività sessuale.

In condizioni naturali trascorre un lungo lasso di tempo (da 6 a 16 settimane) tra infezione e sviluppo delle lesioni genitali ed in questo periodo gli animali non presentano sintomi di sorta. Il germe rimane confinato nel punto di penetrazione e nei linfonodi tributari per 10-14 giorni prima che si abbia batteriemia, generalizzazione e quindi localizzazione in altre sedi (milza, midollo osseo, reni e linfonodi distanti dalla porta di ingresso). Nella fase terminale della batteriemia cominciano ad instaurarsi le lesioni a carico delle vescicole seminali, delle ampolle del dotto deferente, delle ghiandole bulbo-uretrali, della prostata e, soprattutto, dell'epididimo.

Le lesioni, nella maggioranza dei casi localizzate alla coda (più che alla testa) dell'epididimo, sono spesso unilaterali e derivano fondamentalmente da uno spermatocele la cui rottura, con conseguente extravasazione del suo contenuto, determina la formazione di granulomi e di fenomeni aderenziali nonché la comparsa di fibrosi delle strutture adiacenti e, talora, di atrofia testicolare. La natura e la sede delle lesioni hanno effetti deleteri sulla qualità dello sperma e quindi sulla capacità ed efficienza riproduttiva dei montoni. Le alterazioni più evidenti a carico del seme sono caratterizzate da distacco e lacerazione della membrana nucleare della testa degli spermatozoi e da assottigliamento del colletto degli spermatozoi stessi, con successiva separazione della testa dal corpo.

La presenza di epididimite può apprezzarsi mediante un accurato esame di palpazione, ma è tutt'altro che raro che i maschi eliminino *Br. ovis* con l'eiaculato in assenza di qualsivoglia segno clinicamente rilevabile.

L'accertamento della infezione si basa sulla effettuazione di esame di palpazione e/o di indagini colturali e/o di test sierologici. Come ho già detto, nella fase iniziale le lesioni sono difficilmente apprezzabili, specie se bilaterali; d'altra parte si sa che esiste un periodo di latenza clinica durante il quale i segni della flogosi sono riconoscibili solo istologicamente e lo sperma presenta già profonde alterazioni qualitative. In caso di infezione avanzata tuttavia l'epididimo appare aumentato di volume ed in preda a fenomeni sclerotici di grado variabile a seconda della data di inizio della infezione. Il testicolo corrispondente è in genere risparmiato dal processo morboso, ma talvolta manifesta chiari segni di atrofia e fibrosi.

La possibilità di evidenziare *Br. ovis* rimane affidata alla esecuzione di esami microscopici e, soprattutto, batteriologici. Entrambi sono realizzabili

sullo sperma ottenuto per elettroeiaculazione, in caso di aborto sulla placenta, sul feto (contenuto del IV stomaco, polmone, milza, linfonodi ed encefalo), sulla secrezione vaginale e sul latte e, ove si disponga di materiale necroscopico, sulla prostata, sulle ghiandole bulbo-uretrali, oltrechè sull'epididimo.

I test sierologici costituiscono la base della diagnosi sperimentale e quindi il fondamento di ogni programma di controllo e di eradicazione. Fra tutti quelli proposti emergono, per i risultati ottenuti, la immunodiffusione in gel di agar, la fissazione del complemento, l'agglutinazione rapida con antigene al rosa bengala e, in particolare per la sua elevata sensibilità, l'ELISA. Va tuttavia ricordato che il valore diagnostico della sierologia, qualunque metodo si impieghi, è tutt'altro che assoluto per cui, anche facendo ricorso al test immunoenzimatico, esiste la possibilità che arieti negativi e senza evidenti alterazioni degli organi genitali esterni eliminino forti quantità di *Br. ovis* con l'eiaculato.

A differenza di altre brucellosi per le quali la profilassi contempla di norma la eliminazione delle femmine infette eventualmente integrata dalla vaccinazione, il controllo dell'epididimite da *Br. ovis* deve essere orientato sulla prevenzione della infezione nei maschi nonché sulla identificazione e sull'abbattimento di quelli colpiti dalla malattia. La vaccinazione delle pecore appare superflua per i seguenti motivi fondamentali:

- il contagio viene trasmesso esclusivamente dagli arieti
- l'infezione ha breve durata
- il contagio da femmina a femmina è eventualità assai rara.

Per le pecore si deve quindi prevedere l'attuazione di una profilassi sanitaria (controllo sierologico ed eliminazione dei soggetti a reazione positiva).

Il problema profilattico non è stato affrontato in maniera univoca. In alcuni paesi (Australia, Canada, Romania) viene da qualche tempo data la preferenza a programmi drastici, basati sul controllo sierologico degli allevamenti (integrato o meno da visita clinica dei maschi adulti e impuberi, da esami batteriologici dello sperma) e sulla rapida eliminazione dei soggetti riconosciuti infetti. In altri si è ritenuto conveniente associare a queste misure la vaccinazione degli arieti indenni. A tale scopo è stata dapprima indicata la utilizzazione simultanea del B19 e di uno stipite inattivato e adiuvato di *Br. ovis* e, in epoca successiva, una doppia inoculazione di vaccino spento a *Br. ovis* (USA e Nuova Zelanda). In paesi, come il Sud Africa, nei quali è presente la brucellosi da *Br. melitensis*, si è fatto e si fa largo uso dello stipite Rev.1, con risultati oltremodo lusinghieri.

Quale sia la situazione italiana attuale non è possibile dire. L'infezione sembra limitata alle province lombarde ove si alleva la razza bergamasca. I focolai sinora identificati non sono più di 7 o 8. Una vasta inchiesta sieroepidemiologica estesa a tutti gli arieti in produzione negli allevamenti dell'area interessata potrà fornire i dati indispensabili per l'adozione di misure di ordine profilattico. Il largo uso della vaccinazione con il Rev.1 che è stato fatto per il controllo dell'infezione da *Br. melitensis* fino ad epoca recentissima, lascia sperare che la diffusione della malattia sia contenuta in termini modesti.

## LEPTOSPIROSI

Gli ovini sono ritenuti animali poco recettivi alla leptospirosi. Ciò può apparire vero se ci si basa sulla effettiva rarità dei casi in cui l'infezione si traduce in fenomeni morbosi conclamati; lo è invece molto meno se si tiene conto della non trascurabile frequenza con la quale l'infezione stessa si presenta in forme lievi, fruste, asintomatiche oppure con sintomi comuni ad altre malattie con cui può venire confusa.

Senz'altro molto resistenti debbono invece essere considerati i caprini.

Nel corso dell'ultimo decennio tutta una serie di indagini di campo e di ricerche sperimentali, fatte anche in Italia, hanno permesso di acquisire importanti dati relativi alla eziologia, alla epidemiologia, alla diffusione e, in parte, agli aspetti patologici della leptospirosi degli ovini. Tali dati possono essere riassunti come segue:

- l'agente causale primario dell'infezione è, come nei bovini, la sierovariante *hardjo*, genotipo *hardjobovis*;

- di tale sierovariante gli ovini debbono essere considerati ospiti di mantenimento primari, visto che animali infetti possono presentare localizzazione renale ed eliminare leptospire con le urine per tempi lunghi (fino ad 11 mesi). Sotto questo aspetto il loro ruolo epidemiologico è tanto importante quanto quello dei bovini, che rimangono portatori renali per oltre 18 mesi;

- l'attuale frequenza dell'infezione è, in alcuni paesi (Australia, Nuova Zelanda, Gran Bretagna), considerevole. Esiste allo stato endemico in gran parte d'Italia, come testimoniano le inchieste sieroepidemiologiche e i reiterati isolamenti di *hardjobovis* dalle urine e dai reni di animali risultati infetti;

- comparativamente ad altre sierovarianti di *L. intenogans* (*icterohaemorrhagiae*, *canicola*, *pomona*) la *hardjo* è dotata di potere

patogeno intrinseco piuttosto modesto; per tale motivo non evoca mai quadri clinici di evidente gravità. Si mostra tuttavia capace di interferire sullo stato di gravidanza e di provocare aborto tardivo per invasione transplacentare del feto in utero, dando spesso luogo anche a parti prematuri o alla nascita di prodotti apparentemente sani ma portatori di infezione congenita e leptospirurici;

-la paucità e scarsa significatività dei sintomi, il crescente incremento dei focolai infettivi determinato dalla facilità con cui si stabilisce il contagio tra animali viventi in perenne promiscuità rende particolarmente ardua la realizzazione di efficaci piani di controllo e di eradicazione.

Per una più compiuta conoscenza degli effetti della infezione sulla attività riproduttiva sia delle pecore che degli arieti appare essenziale verificare se anche negli ovini, al pari di quanti si verifica nei bovini, la sierovariante *hardjo* ha la capacità di colonizzare e di persistere oltre che nei reni, anche nell'apparato genitale femminile (salpingi ed utero) e maschile (testicolo, epididimo, vescicole seminali, prostata e ghiandole bulbo-uretrali).

Una risposta a questi interrogativi sarebbe quanto mai importante sia sotto il profilo epidemiologico (trasmissione per via venerea dell'infezione?) che sotto il profilo della patologia (responsabilità diretta delle leptospire nel determinismo di fenomeni di ipofecondità nelle pecore e negli arieti?).

# PATOLOGIA DELL'APPARATO RIPRODUTTORE DEGLI OVI-CAPRINI CAUSATA DA CLAMIDIA E DA CAMPILOBACTER

ANDREANI E.

*Dipartimento di Patologia Animale, Profilassi ed Igiene degli Alimenti, Pisa*

Tra le molte cause che provocano patologie a carico dell'apparato riproduttore degli ovi-caprini gli agenti infettivi rivestono un'importanza di primo piano. Essi sono, infatti, i principali responsabili d'infertilità, morte embrionale, mortinatalità, metrite e ritenzione placentare. In particolare per quanto riguarda l'aborto, che è il sintomo più appariscente, quando è dovuto a germi patogeni, esso è associato quasi esclusivamente ad infezioni da brucella, clamidia, salmonella, campilobacter, leptospira, listeria e coxiella. Ai primi tre, comunque, vengono attribuiti il maggiore numero di aborti. Vi è, tuttavia, da rilevare, che in quelle zone del Paese, dove il piano di profilassi nei confronti della brucellosi è stato pienamente attuato, rari o scomparsi del tutto sono gli aborti causati da essa. Restano invece ben presenti, quelli da clamidiosi ed in minor misura quelli da salmonellosi, nei riguardi delle quali non è stata intrapresa alcuna profilassi sistematica.

La nostra attenzione sarà rivolta all'aborto da clamidia e da campilobacter, a quest'ultimo saranno riservati soltanto brevi cenni, data la minor importanza, che esso riveste.

La clamidiosi dell'apparato riproduttore degli ovi-caprini va assumendo in questi ultimi anni un'importanza sempre maggiore sotto il profilo economico e sociale. I molti studi di ordine epidemiologico effettuati nel nostro Paese hanno permesso di rilevare che l'infezione è ampiamente diffusa negli allevamenti ovi-caprini (2,4,6), dove provoca sensibili danni dovuti ad aborto, mortinatalità e perdita di produzione latte. E' stato accertato inoltre che stipiti di clamidia associati ad infezione dell'apparato genitale dei ruminanti domestici sono patogeni per la donna in gravidanza, nella quale provoca aborto (11,15).

Poichè la clamidiosi dell'apparato genitale della capra presenta le stesse analogie con l'infezione della pecora, la trattazione dei vari aspetti della malattia sarà rivolta alla sola pecora.

## Aspetti Eziologici ed Epidemiologici

La nuova classificazione degli agenti appartenenti al genere *Chlamydia* basata anche sulle moderne tecniche di tipizzazione come la composizione chimica del DNA e la omologia del DNA tra i vari stipti riconosce a questo genere quattro specie di clamidie (9, Tabella 1).

Tabella 1 - Principali caratteristiche differenziali delle specie del genere *Chlamydia*.

	C.trachomatis	C.pneumoniae	C.psittaci	C.pecorum
Morfologia dei corpi elementari	Sferici	Piriformi	Sferici	Sferici
Morfologia dei corpi reticolari	Ovali, aspetto vacuolare	Ovali, aspetto denso	Variabili, aspetto denso	Variabili, aspetto denso
Presenza di glicogeno nelle inclusioni	si	no	no	no
Resistenza alla sulfadiazina	no	si	si	si
Contenuto di G+C nel DNA (%)	39,8	40,3	39,6	39,3
Ospiti naturali	uomo topo	uomo	numerose specie	ruminanti

(da Fuzeby, 1993)

Le clamidie hanno un ciclo di sviluppo che include due fasi, una metabolicamente attiva e non infettante, caratterizzata dalla formazione di corpi iniziali, l'altra metabolicamente inattiva ed infettante, contrassegnata dalla costituzione dei corpi elementari (C.E.).

La resistenza di questi ultimi è molto elevata soprattutto nella polvere derivata da feci essiccate infette, dove sopravvivono per lungo tempo.

L'infezione viene di solito introdotta in una greggia indenne con l'immissione di pecore infette in forma latente, che eliminano le clamidie con le feci per un lungo periodo di tempo. L'aborto, comunque, per il notevole numero di microrganismi emessi all'esterno, con i liquidi fetali, gli invogli e gli scoli vaginali, costituisce il momento più favorevole alla diffusione del contagio.

L'infezione è assunta, principalmente, per ingestione di acqua ed alimenti contaminati, o per inalazione di polvere infetta. L'ariete, come la pecora, va incontro ad infezione intestinale e genitale. La trasmissione del contagio per via genitale da maschio a femmina non è stata ancora dimostrata, nonostante sia accertata la presenza di CE nello sperma. Il ruolo che altre specie di mammiferi rivestono nella trasmissione del contagio agli ovini, non è completamente chiarito. Non si può, tuttavia, escludere una trasmissione della malattia dai bovini e dai caprini agli ovini, in particolare dove queste specie vivono in promiscuità, e da ruminanti selvatici a quelli domestici e viceversa. A favore di tale ipotesi sembrerebbero deporre le numerose positività sierologiche evidenziate in Italia nei ruminanti selvatici (Tabella 2). Probabile sembra anche il passaggio dell'infezione da piccioni di città agli ovini, almeno a giudicare degli stessi profili di restrizione, evidenziati dopo digestione con enzima "Alu I" del gene MOMP ampliato mediante PCR, di stipiti di *C. psittaci* abortigeni ovini e di origine aviaria (16). Da rilevare inoltre che questi ultimi sono patogeni per le agnelle gravide, nelle quali, infettate

Tabella 2 - Dati relativi alla presenza di anticorpi per *Chlamydia psittaci* in emosieri di animali posti in alcune zone del nostro Paese, controllati alla FC (titoli di positività  $\geq 1:16$ ) negli anni 1988-1994.

(Esami eseguiti presso i laboratori del Dipartimento di Patologia Animale, Profilassi ed Igiene degli Alimenti - Dati non pubblicati)

Specie animale	N. animali esaminati	N. animali positivi (% pos.)	N. allevamenti esaminati	N. allevamenti positivi (% pos)	Massimo titolo riscontrato
OVINI	2157	601 (27,86)	154	105(68,18)	1024
BOVINI(1)	1100	327(29,72)	51	42(82,35)	128
BUFALI	241	186(77,17)	3	3(100)	512
RUMINANTI SELVATICI (2)	249	118 (47,38%)	-	--	256
PICCIONI (3)	495	263 (53,13)	-	--	2048

(1) Bovine di allevamenti con aborti ed ipofertilità non dovuti ad agenti patogeni più comuni; da 3 bovine con fenomeni di ipofertilità vengono isolati da tamponi cervicali altrettanti stipiti di *C. psittaci*.

(2) Cervi, mulloni, daini stambecchi e camosci; da un daino con cherato congiuntivite viene isolato un ceppo di *C. psittaci*.

(3) Da campioni di visceri e contenuto intestinale di 14 soggetti dei 35 sottoposti ad esame colturale si isola *C. psittaci*.

sperimentalmente, riproducono aborto. Tutto ciò induce a ritenere che vi sia un'ampia circolazione degli stessi ceppi nelle due specie.

Sicuramente è possibile la trasmissione dall'ovino all'uomo (11,15), come hanno riportato Autori inglesi, descrivendo casi di aborto da *C. psittaci* in donne contagiate da liquidi fetali di pecore infette. L'infezione è molto diffusa in Italia, dove è stata diagnosticata a più riprese in diverse specie animali (2,3,4,6,8), tramite la messa in evidenza di anticorpi ematici e anche con l'isolamento dell'agente eziologico da materiale fetale negli ovini e da tamponi cervicali nei bovini (8, Tabella 2). Con uno degli stiptiti isolati la malattia è stata, poi, riprodotta sperimentalmente in agnelle gravide (5).

### ASPETTI PATOGENETICI, CLINICI ED ANATOMO-PATOLOGICI

La malattia, indotta sperimentalmente in agnelle gravide, è caratterizzata da una clamidiemia a seguito della quale *C. psittaci*, una volta pervenuta nella placenta, si riproduce nelle cellule epiteliali delle cripte delle caruncole e dei villi dei cotiledini, inducendo distruzione cellulare ed infiltrazione di macrofagi, neutrofili e linfociti. La perdita dell'epitelio e la successiva necrosi del tessuto sottostante interrompono gli scambi nutritivi materno fetali, ed è forse tale evento, assieme all'azione patogena dell'agente pervenuto negli organi del feto, che contribuisce maggiormente alla morte di quest'ultimo. L'agente colpisce anche vaste zone intercotiledonari della placenta, con distruzione di cellule epiteliali corioniche, edema ed infiltrati dei tessuti sottostanti, nonché accumolo di essudato tra corion ed endometrio.

La distruzione delle cellule epiteliali del corion che, nell'ultima fase delle gestazione, costituiscono la maggior sorgente di progesterone, come è noto responsabile del mantenimento dello stato di gravidanza, ne fa diminuire il tasso. Questo inconveniente, più che causare la morte del feto, stimola anzitempo l'espulsione dello stesso, ed a seconda del periodo in cui avviene l'interruzione della gravidanza, si avranno aborti, mortinatalità e neonati vivi e poco vitali. Le femmine, che si contagiano la prima volta durante la gestazione manifestano aborto nella maggioranza dei casi; in alcune, tuttavia, l'infezione rimane inapparente, senza interferire sulla gravidanza in corso, ma nella successiva può progredire e causare aborto. La pecora abortisce, generalmente, una sola volta ma può rimanere portatrice ed eliminatrice dell'agente causale con le feci.

Il sintomo più frequente è l'aborto, che si verifica, in condizioni naturali, 2-3 settimane prima del termine della gravidanza.

Raramente si riscontrano aborti precoci, dopo 10-12 settimane di gravi-

danza, ed in questi casi il feto si presenta mummificato ed in preda a fenomeni autolitici.

In un gregge sano, contaminato per la prima volta, si rilevano:

- aborti in misura variabile dal 20 al 40%;
- segni abbastanza caratteristici, come coliche e scolo vaginale, che consentono all'allevatore di prevedere, con un certo anticipo, l'interruzione dalla gravidanza;
- espulsione del feto, generalmente senza complicazioni per la madre; sono, infatti, eccezionali la ritenzione di placenta ed i conseguenti fenomeni di metrite settica.

A volte si osservano mortinatalità o parti prematuri con nascita di prodotti vivi ma debilitati e con processi polmonari in atto.

Sebbene il feto, nella gran parte dei casi, venga espulso morto, soggetti apparentemente sani possono nascere ugualmente, anche quando la placenta è interessata da lesioni, e non è insolito, in gravidanze gemellari, assistere alla nascita di un prodotto vivo e vitale, magari infetto, e di uno morto.

Il feto abortito nell'ultimo periodo di gravidanza non mostra fenomeni autolitici; ciò significa che alla morte in utero di questo ha fatto subito seguito l'espulsione dello stesso. Nei soggetti con aborto, segue di norma, per alcuni giorni, uno scolo uterino di colore chiaro. In un gregge con infezione endemica vengono colpite le primipare e le femmine sane di recente introduzione e l'aborto si verifica solo nel 10 - 15% dei soggetti gravidi. Meno frequenti risultano le lesioni a carico degli organi genitali maschili sotto forma di orchiti ed epididimiti.

Osservazioni scaturite da infezioni naturali e sperimentali hanno fatto rilevare che le lesioni più tipiche e caratteristiche si riscontrano sulla placenta. Gli invogli di feti abortiti, di agnelli nati prematuri o nati a termine ma debilitati, presentano alterazioni diverse per entità ed estensione. Nei casi più gravi la placenta è edematosa e cosparsa di emorragie, e sui cotiledoni si apprezzano aree di necrosi di dimensioni variabili, che possono interessare in toto tali strutture che assumono colore argilla-opaco, in netto contrasto con il rosso porpora dei tessuti normali circostanti. Negli spazi intercotiledonari, sono evidenti aree estese di necrosi ed anche zone edematose ed asciutte, all'apparenza simili al cuoio. Un essudato, di color giallo-brunastro, cosparsa di frustoli, di materiale simil-caseoso dello stesso colore, può ricoprire queste zone. I feti abortiti nell'ultimo periodo di gravidanza vengono ritenuti solitamente per brevissimo tempo in utero dopo la morte e non presentano quindi fenomeni autolitici; alcuni di essi, tuttavia appaiono ingrossati per

accumolo di abnormi quantità di liquido in cavità pleurica e peritoneale, e per aumento di volume del fegato e della milza. In altri si rilevano diffuse emorragie puntiformi sulla cute, nel sottocute, nelle ghiandole salivari e nei linfonodi, nonché focolai necrotici negli organi interni e nei linfonodi. I feti espulsi durante il primo periodo di gravidanza, essendo trattenuti in utero per più giorni, sono in preda a fenomeni autolitici ed alcuni possono essere mummificati.

### *ASPETTI DIAGNOSTICI, TERAPEUTICI E PROFILATTICI*

La malattia può essere sospettata sulla base dei dati epidemiologici, clinici e necroscopici, precedentemente riportati.

Per una diagnosi certa, tuttavia, è necessario evidenziare l'agente eziologico attraverso esami microscopici e colturali, da eseguirsi su feto o placenta, che dovranno pervenire in laboratorio in cassetta refrigerata, entro poche ore dalla loro espulsione. In alternativa si può ricorrere a tests sierologici per svelare la presenza di anticorpi specifici. La fissazione del complemento costituisce il test di più largo impiego e con essa gli anticorpi negli animali si riscontrano a livelli minimi al momento dell'aborto, risalgono poi rapidamente, e raggiungono i massimi valori a circa 21 giorni dall'interruzione della gravidanza, dopo di che iniziano a diminuire.

La terapia a base di antibiotici non viene praticata. La somministrazione di antibiotici è impiegata nella profilassi dell'aborto.

La prevenzione dell'aborto nella pecora è strettamente legata al controllo dell'infezione, per combattere la quale si può ricorrere all'impiego di antibiotici o di vaccini. Negli allevamenti infetti, per ottenere la sospensione degli aborti, con l'impiego di antibiotici è necessario somministrare tetraciclina in modo continuativo in ragione di 350 mg/pro die a capo a tutte le femmine gravide, che non hanno abortito nella precedente gestazione, a partire dal 2°-3° mese di gravidanza. Una diminuzione del numero degli aborti si può conseguire, con trattamenti saltuari, ricorrendo a tre inoculazioni di tetraciclina long acting, 20mg/kg p.v., da praticarsi a distanza di due giorni una dall'altra od una sola inoculazione bisettimanale, da effettuarsi fino al termine della gestazione.

La profilassi immunizzante è basata sull'impiego di vaccini spenti, che somministrati nelle agnelle prima dell'accoppiamento, dimostrano un potere protettivo non sempre soddisfacente.

## PATOLOGIA DELL'APPARATO RIPRODUTTORE DEGLI OVI-CAPRINI DA CAMPILOBACTER

A differenza della clamidiosi, che colpisce ugualmente l'apparato riproduttore della pecora e della capra, la campilobacteriosi si riscontra soprattutto in quello della prima ed è a questa che facciamo riferimento nel trattamento.

Nella pecora la campilobacteriosi è caratterizzata da aborto ad andamento enzootico, ed è sostenuta da *Campylabacter fetus susp. fetus* (CFSF) più raramente da *Campylobacter jejuni*.

Scarse sono in Italia le segnalazioni di casi di aborto negli ovini da campilobacter. Le uniche due riscontrate in letteratura sono opera di Sanguinetti e Pietrobelli (1980)(14) e di Ligios e coll.(1994) (12). I primi evidenziarono *C. Jejuni* da feti abortiti di un gregge dell'Emilia-Romagna. I secondi, esaminando batteriologicamente dal 1989 al 1993, 831 feti provenienti da 660 allevamenti della Sardegna isolarono *C.jejuni* da feti abortiti di due allevamenti nei quali si erano manifestati aborti nel 3% e nel 24% delle pluripare. L'esame necroscopico eseguito su 12 feti evidenziava caratteristiche aree necrotiche del diametro variabile da 2 a 3 cm, leggermente rilevate, di colorito giallo arancio pallido con ampia zona centrale marrone. Gli aspetti epidemiologici e patogenetici della campilobacteriosi sono del tutto analoghi a quelli della clamidiosi. L'aborto si ha in misura variabile dal 5 al 60% dei soggetti gravidi ed iniziano 1 o 2 mesi prima dei parti. Casi di mortalità conseguenti a forme setticemiche da postumi di metrite sono rari. Le principali lesioni del feto sono costituite da edema sottocutaneo, petecchie sulle sierose e focolai necrotici in sede epatica. In alcuni casi il feto può presentarsi in avanzato stato di decomposizione. Sulla placenta si apprezzano aree emorragiche, edema diffuso ed accentuata iperemia dei cotiledoni. Molto spesso si hanno segni di decomposizione ed i cotiledoni assumono una colorazione giallastra. Per la diagnosi occorre mettere in evidenza l'agente eziologico attraverso esami batteriologici. Il rilievo di anticorpi agglutinanti e fissanti il complemento nel siero di sangue assume minor attendibilità. La terapia antibiotica si dimostra scarsamente efficace, mentre la somministrazione quotidiana di tetracicline a tutte le agnelle gravide a partire dal momento dell'accertamento del focolaio e continuata fino al termine del periodo dei parti, riduce l'incidenza degli aborti. La profilassi immunizzante, attuata con vaccini inattivati, ha fornito risultati abbastanza soddisfacenti.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Andreani E., Aitken I.D., Cerri D., Poli A., *Chlamydiosi ovina. Isolamento dell'agente eziologico e rilievi anatomoistopatologici.* Atti Soc.It.Sc.Vet.,37: 662-665,1983.
- 2) Andreani E., Cerri D., Legrottaglio R., *Chlamydiosi ovi-caprina. Indagine siero-epidemiologica sulla diffusione in allevamenti di alcune province italiane.* Clin.Vet.,106:219-223, 1983.
- 3) Andreani E., Legrottaglio R., Gianfaldoni D.,Tolari F., *Chlamydiosi bovina .Ricerca di anticorpi in emosieri di animali apparentemente sani.* Clin.Vet.,106.243-246, 1983.
- 4) Andreani E., Cerri D., Frunzo E., *Chlamydiosi caprina. Ricerca di anticorpi in animali d'importazione ed in greggi di alcune province italiane.* Atti Soc. It. Sc. Vet.,40:943-946,1986.
- 5) Andreani E., Tolari F., Cerri D., Farina R., Bandecchi D., *Experimental infection in sheep with Chlamydia psittaci.* Br.Vet.J.,143:221-225,1987.
- 6) Andreani E., Cerri D., *Epidemiological observation on chlamydial infection and disease of mammals and pigeons, in Proceeding of the European of the Society for Chlamydia Research, May 30th-Yune 1st.Ed. Esculapio, Bologna,1988, p.62.*
- 7) Cerri D., Andreani E., Farina R., Perelli G. *Indagine sieroepidemiologica sulla diffusione della chlamydiosi in piccioni di città della Toscana.* Atti Soc.It.Sc.Vet.,43:801-804,1989.
- 8) Cerri D., Bandecchi P., Andreani E., Farina R., Abbate G., *Indagine siero-epidemiologica sulla diffusione della clamidiosi in alcuni allevamenti di bovine.* Atti Soc.It.Sc.Vet.,44:1043-1045,1990.
- 9) Euzéby J.P., *Les modifications apportées a la nomenclature bactérienne durant l'année 1992 et leur importance en médecine vétérinaire.* Révue Méd.Vet.,144 (1):13-38,1993.
- 10) Farina R., Scatozza F., *Trattato di Malattie di Infettive degli Animali.* UTET 1995, pp 451-461.
- 11) Johnson F.W.A., Matheson B.A., Williams E., *Abortion due to infection with Chlamydia psittaci in a sheep farmer's wife.* Br.Vet.J.,209:592-594,1985.
- 12) Ligios C., Liciardi M., Satta G., Depalmas S., *Aborto da Campylobacter jejuni negli ovini della Sardegna: Aspetti epidemiologici ed anatomopatologici.* Atti Soc.It.Sc.Vet.,48 (in corso di stampa), 1994.
- 13) Pedrini A., Nuvoloni R., Andreani E., Farina R., *Infezione sperimentale in agnelle gravide con Chlamydia psittaci di origine aviare.* Atti Soc.It.Sc. Vet., 47:1097, 1993.
- 14) Sanguinetti V., Pietrobelli M., *Isolamento di Campylobacter fetus subs jejuni nella pecora e nel mullone sardo.* Atti Soc.It.Sc.Vet., 34:327, 1980.
- 15) Wong S.Y., Gray E.S., Buxton D., *Acute placentitis and spontaneous abortion caused by Chlamydia psittaci of sheep origin: a istological and ultrastructural study.* J.Clin.Pathol., 38:707-711,1985.
- 16) Dati non pubblicati.

# PARASSITOSI E ATTIVITÀ RIPRODUTTIVA DEGLI OVINI

ARRU E. \*, PAU S.\*\*

*\*Istituto di Ispezione degli alimenti di origine animale e Cattedra di Malattie Parassitarie degli animali domestici,*

*\*\*Istituto di Ostetricia e Ginecologia Veterinaria, Sassari.*

## SUMMARY

### *EFFECT OF PARASITOSIS ON REPRODUCTION IN SHEEP*

The mechanism of the action of parasites on reproduction are shown and correlated to puberty, fertility, prolificacy and pregnancy. The limited importance of the direct action of parasites on the reproductive system is indicated while attention is drawn to their indirect action, causing glucide, protein, vitamin, mineral and trace element deficiencies. The AA. conclude by pointing out an analogy with lack of food and emphasize the advisability of adequate checking.

## PREMESSA

E' noto da tempo che alcune parassitosi, in particolare determinate malattie protozoarie, possono interferire negativamente con la riproduzione e segnatamente sulla gravidanza. Negli ultimi anni, con l'avanzamento delle conoscenze, le parassitosi in generale hanno acquisito importanza quale fattore deprimente la capacità riproduttiva dei mammiferi. Il fenomeno è stato evidenziato particolarmente nei ruminanti e assume maggior valenza nei soggetti allevati allo stato semibrado (condizione riferibile a gran parte degli ovi-caprini sardi) in quanto esposti alle infestioni da pascolamento e da stabulazione; conseguentemente il danno provocato dalle diverse specie parassitarie in questi animali, non solo si somma, ma viene amplificato a livello generale dalla loro azione sinergica. Va inoltre sottolineato che nelle endoparassitosi, quando si manifesta la sintomatologia clinica, le ripercussioni sulla funzionalità riproduttiva sono già in atto. L'intervento negativo dei parassiti sulle diverse fasi riproduttive dell'ospite (pubertà, ciclo estrale, gravidanza e postpartum nella femmina; pubertà, spermatogenesi e libido nel

maschio) si esplica, prevalentemente in modo indiretto, attraverso la loro molteplice e complessa azione patogena (Tab. n° 2).

### AZIONI DEI PARASSITI

In questa sede si ricordano i punti essenziali.

Notevole importanza riveste al riguardo l'azione spoliatrice-dismetabolizzante, intesa come sottrazione quanti-qualitativa di alimento, ma soprattutto quale fattore da correlare all'anoressia, alla cattiva digestione e al malassorbimento, oltre che alle turbe metaboliche.

L'anoressia è da alcuni ritenuta una conseguenza della dolorabilità, dell'alterata motilità dell'apparato digerente e delle modificazioni enzimatiche ed ormonali, ma nel complesso le cause e i meccanismi di azione sono ancora da chiarire. E' noto invece che essa ha una importanza primaria nei confronti delle turbe metaboliche, responsabili negli ovini infestati da *Trichostrongylus colubriformis* e da *Ostertagia circumcincta*, di una riduzione dei depositi adiposi e proteici del 30-40% e addirittura del 60% dell'incremento ponderale. E' importante inoltre ricordare che la perdita di appetito è, tra l'altro, direttamente proporzionale alla frequenza dell'infestazione e perciò si manifesta maggiormente negli animali che pascolano quotidianamente in terreni contaminati.

La *Digestione* risente innanzitutto dell'azione diretta dei parassiti a carico dei diversi organi dell'apparato digerente, di fondamentale rilevanza sono le modificazioni delle secrezioni dell'abomaso, in particolare dell'HCl, che comportano cospicue variazioni del pH, limitano l'azione degli enzimi proteolitici nonché la produzione e l'attivazione del pepsinogeno. Inoltre mentre negli animali parassitati il contenuto del ruminone si riduce, aumenta per contro la quantità di liquidi e di materiale alimentare nell'abomaso, con alterazione delle attività motorie: l'infestazione da *T. axei* e da *Chabertia ovina* riducono del 40-60% le contrazioni abomasali.

Dal canto loro le lesioni a carico dell'intestino abbassano notevolmente il tasso di maltasi, peptidasi, e fosfatasi alcalina. Le attività enzimatiche dell'intestino tenue possono ridursi del 50-90% in presenza di gravi danni cellulari: nelle infestazioni da *Ostertagia* e *Cooperia spp.* la digestione delle proteine può complessivamente diminuire del 24%. Non va però dimenticato che la digestione di alcuni componenti alimentari può essere influenzata anche dalle parassitosi epatiche.

Ovviamente l'enterite è anche la maggiore responsabile della *diarrea* e del *malassorbimento*. La prima implica un'eccessiva perdita di K, Ca, Fe,

Mg e di altri componenti alimentari, comprese le vitamine, la seconda determina un carente assorbimento di tali sostanze con abbassamento dei rispettivi tassi nel siero. Le parassitosi gastrointestinali inibiscono altresì la trasformazione del  $\beta$ -carotene in vitamina A.

Al depauperamento di questi elementi contribuisce inoltre l'azione spoliatrice diretta sia dei parassiti ematofagi che dei chimivori. Ad esempio alcuni ematofagi (*Haemoncus spp.*) necessitano di Fe e di Co per il loro accrescimento mentre i chimivori assorbono in prevalenza Ca e P.

E' ancora da rilevare che, all'azione a carico dell'apparato digerente di cui si è fatto cenno, va eventualmente sommata quella sugli apparati cutaneo, muscolare e respiratorio che è causa frequente di anemia, di algia, di ipossia, ecc. Infine, non sono da trascurare le azioni tossica, sensibilizzante e favorente le infezioni secondarie, talvolta alla base di imponenti processi allergici o infiammatori, capaci di provocare danni irreparabili specialmente nei soggetti gravidi.

### PARASSITOSI E PUBERTÀ

Quanto esposto aiuta a intravedere la correlazione tra le parassitosi e la riproduzione, e in primo luogo con la pubertà. Da un punto di vista pratico la pubertà è quel periodo della vita nel quale l'animale raggiunge la capacità di riprodursi. E' condizionata da fattori diversi quali la razza, l'età, l'ambiente, la stagione, ecc. ma soprattutto dall'alimentazione. Fondamentale perché gli animali conseguano la pubertà è che il loro peso corporeo raggiunga il 60% circa di quello da adulto e che il rapporto tra massa muscolare magra e grasso non sia inferiore alla specifica soglia. Questa condizione si raggiunge prima negli animali sani che ricevono una corretta alimentazione mentre è ritardata dalla presenza dei parassiti.

Le coccidiosi, che colpiscono gli agnelli stabulati durante l'allattamento, ma specialmente nel periodo dello svezzamento, determinano enteriti di varia entità con perdita di numerose cellule epiteliali. La disepitelizzazione altera sensibilmente le normali funzioni intestinali con ripercussioni negative sulla crescita.

Le infestioni da strongili gastrointestinali e broncopolmonari che gli agnelli contraggono subito dopo l'immissione al pascolo, nel periodo primaverile, sono altrettanto pregiudizievoli per l'accrescimento e per il tempestivo raggiungimento della pubertà.

Le infestioni massive da *Moniezia spp.* provocano una consistente azione spoliatrice e tossica con conseguente decadimento dello stato di nutrizione e

sensibili ritardi della crescita. In tal senso agiscono anche le epatiti traumatiche causate dalla migrazione delle oncosfere di *Taenia hydatigena* del cane.

Il ritardo della pubertà in animali a riproduzione stagionale come gli ovini, nei quali la comparsa dei calori è legata al fotoperiodo decrescente, può far slittare il primo parto anche di un anno, con perdite significative per l'allevatore.

## PARASSITOSI E FECONDITÀ

I parassiti rientrano tra i fattori che condizionano la fecondità interferendo sull'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi e, pare, anche su tiroide (riduzione di T4) e cortico-surrene (aumento del cortisolo plasmatico).

Le carenze dei principi nutritivi provocate dalle parassitosi sono causa di alterazioni della fertilità e fecondità nei soggetti puberi. Cospicuo interesse assumono vitamine e minerali, per quanto sia difficile stabilire il ruolo di ciascun elemento, anche perché gli studi in proposito riguardano soprattutto il bovino. Alte concentrazioni di carotene sono normalmente presenti nel plasma ematico, nel liquido follicolare e segnatamente nel corpo luteo dei soggetti con buoni standard riproduttivi. La loro carenza è stata associata a diminuita percentuale dei concepimenti, aborto, minore resistenza alle infezioni in gravidanza, ritenzione placentare e ipovitalità neonatale.

In tutte le parassitosi sostenute da ematofagi (zecche, nematodi, trematodi) si osservano, oltre a diminuiti valori dell'ematocrito e della glicemia, ridotta concentrazione del colesterolo e quindi di lipoproteine, essenziali per il trasporto delle vitamine liposolubili. Ad esempio, l'ematofagia che si verifica ad opera dei parassiti adulti nella fascioliasi cronica e l'istofagia, associata alle lesioni emorragiche ad opera delle giovani fasciole in migrazione nel parenchima epatico, determinano variazioni di alcuni parametri ematici, alterazioni della digestione, diminuita possibilità di riserva e di utilizzo del glicogeno e delle vitamine liposolubili.

Meccanismi calcio dipendenti sono coinvolti nella sintesi degli steroidi a livello ovarico. La carenza di Ca e P può tra l'altro determinare ridotta funzionalità ovarica, mentre un supplemento di E e di Zn può portare ad un notevole aumento della percentuale dei concepimenti.

Il Cu, favorendo l'azione della prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ), modulerebbe, di conseguenza, anche il rilascio del fattore ipotalamico (GnRH) che a sua volta induce l'increzione delle gonadotropine ipofisarie (LH in particolare); inoltre, assieme ad altri oligoelementi come Co e Mg, determina un aumento della fertilità.

Il Co è indispensabile per la sintesi microbica della vit. B12 che, con le altre vitamine del gruppo B, interviene in molte reazioni metaboliche, necessarie per la riproduzione e lo sviluppo del prodotto del concepimento.

La carenza di Co nelle pecore adulte determina sterilità e scarsa tendenza alla maternità.

Indagini sperimentali condotte sul campo negli ovini mediante somministrazione di Albendazolo a lento rilascio hanno evidenziato un aumento della fertilità (11,5 %) e della prolificità (6,5%) rispetto ai controlli. Queste indagini confermano ulteriormente i vantaggi derivanti da un prolungato controllo delle strongilosi gastrointestinali e broncopolmonari.

### PARASSITOSI E GRAVIDANZA

Nella gravidanza l'organismo necessita di un apporto crescente soprattutto di proteine, glicidi e minerali che, quando la razione è insufficiente, vengono forniti al prodotto del concepimento dalle riserve materne.

Le parassitosi, intervenendo in questi processi, possono di per sè indurre scadenti condizioni generali nella madre, con conseguente stato di sofferenza del feto, ridotto accrescimento e talvolta morte. Nell'ultimo periodo della gravidanza possono altresì contribuire all'instaurarsi di paresi o paraplegie per inanizione o ipocalcemia.

Nei soggetti con parassitosi dell'abomaso si riscontra un aumento del pH, anche nel duodeno (intorno a 6,5), che fa precipitare il fosfato di calcio limitando il tasso di assorbimento di Ca e P. Nelle parassitosi intestinali, e specificatamente nelle infestioni continue da *T. colubriformis*, si registra ipofosfatemia ed osteoporosi.

Nelle pecore gravide alimentate con una dieta povera di Ca le parassitosi intervengono nel determinare le condizioni favorevoli all'instaurarsi dell'ipocalcemia o "paresi da parto" che, a differenza dei bovini, si presenta anche alcune settimane prima del parto. Tale sindrome è inoltre favorita da fattori stressanti e andrebbe distinta dalla tossicosi gravidica e dall'ipomagnesiemia.

La carenza di Ca può predisporre a distocia, ritenzione placentare e/o ritardata involuzione dell'utero.

Di scarso rilievo è invece, nel complesso, l'azione diretta dei parassiti sull'apparato genitale degli ovini. L'infestione transplacentare è di fatto accidentale nelle elmintiasi (giovani fasciole, embrioni di tenidi) ed è poco frequente anche nelle malattie protozoarie. Tra i protozoi in grado di superare la barriera placentare sotto forma di tachizoiti è in primo luogo da ricordare

*Toxoplasma gondii*. Gli animali a rischio sono prevalentemente le “agnelle” e le lesioni possono interessare la placenta o il feto, in relazione a fattori diversi e specialmente al periodo della gravidanza. In generale se l’infezione si verifica nel primo periodo provoca morte e riassorbimento embrionale, con una sindrome di infertilità; se a metà circa della gravidanza determina morte fetale, seguita da aborto per la presenza di caratteristiche aree di necrosi nei cotiledoni; se a fine gravidanza le ripercussioni maggiori si osservano a carico del feto con nati morti o con sintomatologia nervosa spesso incompatibile con la vita.

In merito alla comparsa delle lesioni encefaliche nei neonati è da ricordare che molti dei casi attribuiti in passato a *T. gondii* sarebbero riconducibili a *Neospora caninum*. I due protozoi sono ritenuti molto simili e le lesioni vanno perciò opportunamente differenziate.

Sperimentalmente è stato dimostrato che anche le infestioni massive da sarcosporidi, e in particolare da “*Sarcocystis gigantea*”, possono essere causa di aborto.

Da ricordare inoltre che verso la fine della gravidanza e all’inizio della lattazione i parassiti, approfittando delle minori difese immunitarie dell’ospite, incrementano la loro attività riproduttiva.

Allo stesso modo le parassitosi interferiscono sulla capacità riproduttiva del maschio causando ritardo della pubertà, diminuita libido e fertilità. La funzionalità dell’apparato riproduttore è sostenuta, in prevalenza, da vitamine e oligoelementi: Vit. A ed E, così come Se, Zn e I, agiscono soprattutto sulla spermatogenesi, mentre la Vit. C favorisce la motilità spermatica.

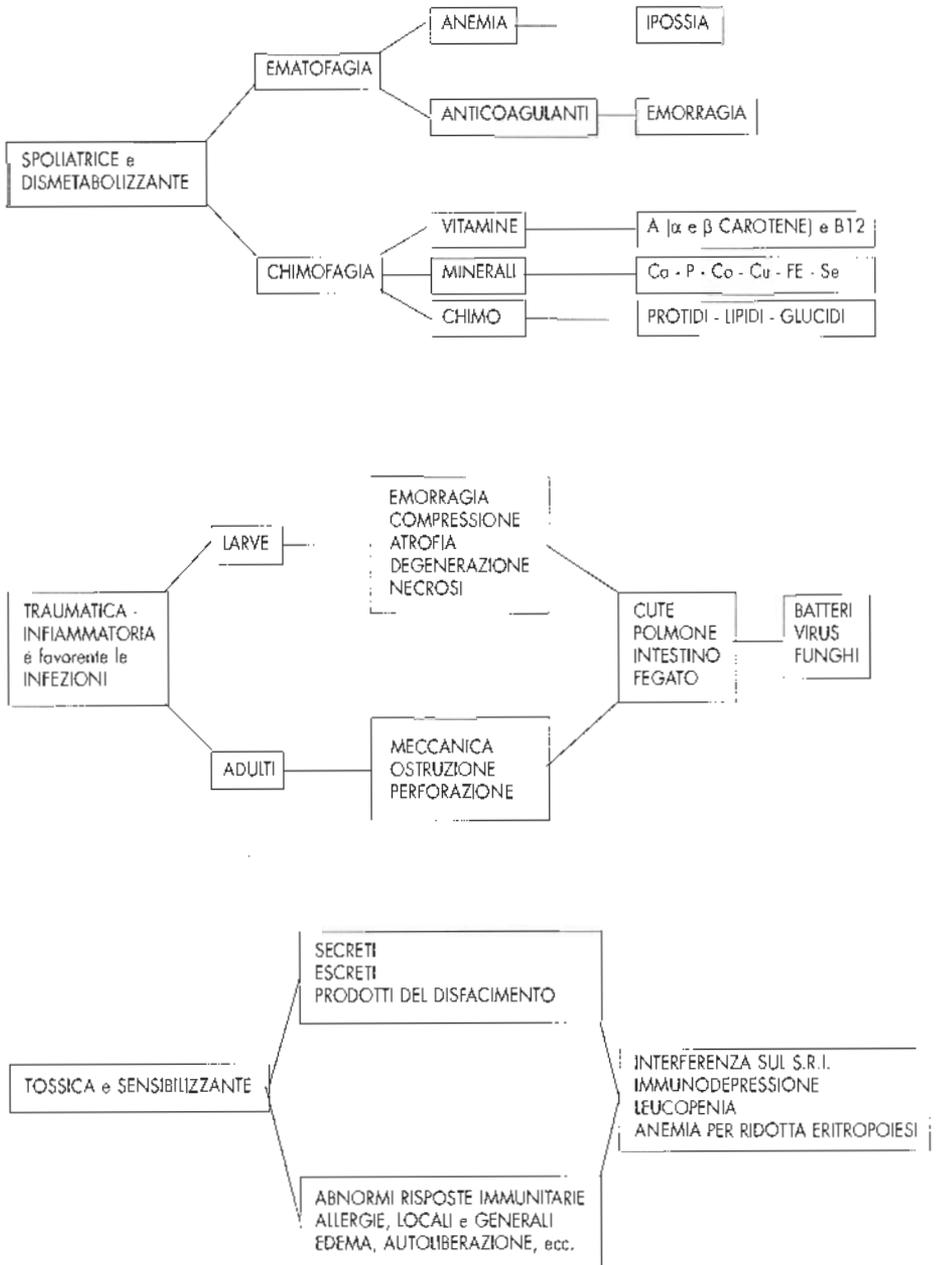
In modo indiretto possono agire al momento del salto endoparassitosi massive in fase acuta (muscolari, polmonari, ecc.).

Le ectoparassitosi, invece, possono esplicare sia azione indiretta che diretta. Un esempio di azione diretta è dato dalla rogna corioptica, occasionalmente localizzata allo scroto, che altera l’efficacia dei meccanismi di termoregolazione e può causare sterilità temporanea e talvolta anche permanente.

Tabella 1 - Principali ecto-endoparassitosi degli ovini

CUTE	ARTROPODI	Sarcoptes (Rogna sarcoptica) Psoroptes (rogna psoroptica) Chorioptes (rogna chorioptica) Bovicola ovis Melophagus ovinus Ixodes spp. (zecche)
POLMONI	NEMATODI	Dictiocaulus filaria Protostrongylus rufescens Mullerius capillaris Cystocaulus ocrestus Neostrongylus linearis
RUMINE	TREMATODI	Paramphistomum spp.
ABOMASO	NEMATODI	Haemoncus contortus Ostertagia circumcincta Trichostrongylus axei
INTESTINO TENUE	NEMATODI	Nematodirus spp. Trichostrongylus spp. Cooperia spp. Strongyloides papillosus Bunostomum trigonocephalum
	CESTODI	Moniezia spp. (teniasi)
	PROTOZOI	Eimeria spp. (coccidiosi)
GROSSO INTESTINO	NEMATODI	Oesophagostomum spp. Chabertia ovina Trichuris ovis
FEGATO	TREMATODI	Fasciola hepatica (distomatosi) Dicrocoelium dendriticum
VASI	TREMATODI	Schistosoma bovis
	PROTOZOI	Babesia spp.

Tabella 2 - Azioni dei parassiti



## CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

Quanto sinteticamente esposto può dare un'idea delle modalità di intervento dei parassiti sul ciclo riproduttivo degli ovini; modalità che, in ultima analisi, portano generalmente ad un ridotto apporto di principi nutritivi, e cioè ad una condizione assimilabile a quella di una alimentazione quanti qualitativamente insufficiente. Questa evenienza è comune nelle parassitosi plurime dell'apparato digerente dove però assume una valenza superiore rispetto alle carenze alimentari. Le parassitosi infatti provocano deficienze multifattoriali che si normalizzano solamente con la risoluzione delle lesioni gastroenteriche. Pertanto, in questi casi, un supplemento alimentare (flushing) potrebbe essere insufficiente per riportare gli animali ad una ottimale condizione riproduttiva.

Da rilevare che deficienze alimentari anche lievi di glucidi, proteine, Cu, Mg, I, P, Ca, Co e Vit. A non consentono di elaborare valide difese immunitarie e favoriscono le infestioni. Animali che pascolano in terreni dove la presenza di larve infestanti è inferiore a 2.000-5.000 per Kg di erba, considerata la soglia minima dannosa per l'ovino, risultano di norma portatori di pochi parassiti e privi di sintomatologia clinica. I parassiti tuttavia concorrono al progressivo impoverimento dei principi nutritivi di cui gli animali sono carenti e ne aggravano le conseguenze. Ne consegue che, anche nei confronti delle strongilosi gastrointestinali pauciparassitarie, si dovrebbero attuare adeguate misure di profilassi sugli animali (prodotti a lento rilascio) o sui pascoli (profilassi ecologica).

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Cupps P.F.: *Reproduction in Domestic Animals*, Ed. Academic Press, Inc New York (1991).
- 2) Dorchies P.: "Sel Vet." 32, 2, 1623-1630 (1991).
- 3) Euzéby J.: "Rev. Méd Vét." 111, 564-593 (1960).
- 4) Hungerford T.G.: *Diseases of Livestock*, Ed. Mc Graw Hill Book Company Sydney (1990).
- 5) Hurley W.L. e Doane R.M.: "J. Dairy Sci." 72, 3, 784-804 (1989).
- 6) Laing J.A.: *Fertility and Infertility In Domestic Animals*, Ed. Baillière Tindall, London (1979).
- 7) Mage C. e Pothier F.: "Revue Méd. Vét." 141, 851-854 (1990).
- 8) Martin W.B.: *Malattie della Pecora*, Ed. Esculapio Bologna, trad. Ital. di Cilli V., (1986).
- 9) Mc Donald L.E.: *Veterinary Endocrinology and Reproduction*, Ed. Lea & Febiger Philadelphia (1975).

- 10) Mitchell D., Hidiroglou M., Jenkins K.J.: "Can. J. Anim. Sci." 55, 513-517 (1975).
- 11) Morrow D.A.: *Current Therapy in Theriogenology*, Ed. Saunders W.B. Comp. Philadelphia (1986).
- 12) O'Kelly J.C.: "Sel. Vet." 30, 1, 899- 902 (1989).
- 13) Perez y Perez F.: *Fisiopatologia de la Reproduccion Animal*, Ed. Cientifico-Medica Barcellona (1969).
- 14) Rhodes A.P.: "Aust. Vet. J." 51, 9, 428432 (1975).
- 15) Smithcoors J.F. e Catcott E.J.: *Progres in Cattle and Sheep Practice*, II Ed. Arn. Vet. Public. Inc. Illinois (1969).
- 16) Sykes A.R. e Coop R.L.: in *The Management and Diseases of Sheep*, Ed. Commonwealth Agricultural Bureaux, Edinburg (1978).
- 17) Wiltbank M.C., Diskin M.G., Niswender G.D.: "J. Reprod. Fert., Suppl." 43: 65-75, (1991).

# APPARATO GENITALE FEMMINILE DELL'OVINO SARDO: ALTERAZIONI ANATOMO PATOLOGICHE E IPOFECONDITÀ

LEONI A.\*, PAU S.\*\*, ZEDDA M.T.\*\*, NIEDDU A.M.\*

*\*Istituto di Patologia Generale e Anatomia Patologica Veterinaria,*

*\*\*Istituto di Ostetricia e Ginecologia Veterinaria, Sassari.*

## RIASSUNTO

Gli AA. riferiscono sulla patologia osservata in 1177 apparati genitali femminili di ovini sardi regolarmente macellati. Nel complesso n° 293 di essi sono risultati sede di alterazioni a differente localizzazione e gravità; n° 76, in particolare, erano colpiti da lesioni sicuramente causa di ipofecondità o sterilità.

Gli AA. segnalano inoltre il riscontro relativamente frequente di lesioni fibro-calcifiche e trombotiche a carico delle arterie uterine ed ovariche.

## SUMMARY

A survey was carried out on ovine female genital tracts collected from slaughtered Sardinian sheep. Of 1177 apparatus, 293 showed different lesions in various sites, 76 of which were considered as a cause of sterility or ipofecundity.

The AA. report the frequency of thrombosis and fibrous calcification in ovarian and uterine arteries.

Lo studio delle alterazioni anatomico-patologiche dell'apparato genitale femminile dell'ovino è stato affrontato da vari AA. e, in particolare per quanto riguarda l'ovino sardo, indagini preliminari sono state condotte da Biolatti e coll. (5 - 6) che ne hanno comparato la patologia con quella di pecore di differente razza, allevate in Piemonte.

Nella presente relazione, in base all'esperienza acquisita sull'ovino sardo, riferiremo sui risultati relativi all'arco di due anni di ricerca.

Per praticità e organicità l'argomento verrà esposto illustrando, separatamente per i diversi tratti dell'apparato genitale (Tab. 1, 2, 3 e 4), le principali lesioni osservate.

<i>Apparati genitali</i>	n°	%
totale esaminati	1177	100,00
negativi	611	51,91
gravidi	273	23,19
con alterazioni	293	24,89
con alterazioni causa di ipofecondità o sterilità	76	6,46

Tabella 1 - Compendio dei risultati.

<i>Alterazioni</i>	n°	%
corpi lutei cistici e cisti luteiniche	22	1,87
cisti follicolari	1	0,08
ovariti	1	0,08
periovariti	2	0,17
aderenze post-ovulatorie	105	8,92
cisti paraovariche	114	9,69
aplasia ovarica	1	0,08
neoplasie	1	0,08

Tabella 2 - Alterazioni ovariche.

<i>Alterazioni</i>	n°	%	
idrosalpinge	1	0,08	
salpingite	cosinofilica	1	0,08
	purulenta	2	0,17
melanosi	8	0,68	
aderenze ovarico-bursali	2	0,17	
<i>Cisticercus tenuicollis</i>	4	0,34	
cisti paratubariche	3	0,25	
cisti salpingee	10	0,85	
neoplasie	1	0,08	

Tabella 3 - Alterazioni della salpinge e della borsa ovarica.

## OVAIO

In ordine di frequenza, le alterazioni più comunemente osservate sono risultate le cisti paraovariche, le aderenze postovulatorie, i corpi lutei cistici e le cisti luteiniche.

Le *cisti paraovariche*, dilatazioni cistiche di residui dei tubuli del mesonefro (epooforo), acquistano importanza patologica solo se di rilevanti dimensioni poiché, in tal caso, potrebbero interferire sulla funzionalità della borsa ovarica e dell'infundibolo limitandone la capacità di raccolta degli oociti.

Tali cisti vanno differenziate da *Cisticercus tenuicollis* a localizzazione paraovarica che può essere responsabile di analoga alterazione funzionale.

Le aderenze post-ovulatorie, caratterizzate da un numero variabile di sottili lacinie che collegano la superficie dell'ovaio con borsa ovarica e salpinge, vista l'esiguità complessiva della lesione, sono comunemente ritenute fattore ininfluenza sulla fecondità.

In merito ai *corpi lutei cistici*, distinguibili dalle cisti luteiniche p.d. per la presenza della papilla da ovulazione (tessuto luteinico che protrude sulla superficie ovarica laddove si è verificata la rottura del follicolo), va ricordato che la cavità che li caratterizza è fisiologica durante lo sviluppo del corpo luteo. Dal punto di vista funzionale è discussa la loro persistenza oltre il periodo diestrale fisiologico.

<i>Alterazioni</i>	<i>n°</i>	<i>%</i>
idrometra	1	0,08
endometrite catarrale	29	2,46
endometrite catarral purulenta	8	0,68
endometrite purulenta e piometra	5	0,42
ritenzione placentare	1	0,08
perimetrite	9	0,76
csiti di taglio cesareo	2	0,17
mortalità embrionale o fetale	7	0,59
macerazione fetale	2	0,17
feti mummificati extrauterini	2	0,17
melanosi uterina	13	1,10
malformazioni	1	0,08
neoplasie	1	0,08
cerviciti	11	0,93
melanosi cervicale	2	0,17
lesioni vascolari leg. largo:		
<i>trombosi</i>	10	0,85
<i>alterazioni fibro-calcifiche</i>	8	0,68

Tabella 4 - Alterazioni dell'utero e della cervice.

Le *cisti luteiniche p.d.* sono state da noi riscontrate solo nei due casi di periovarite (foto I) dove l'assenza di epitelio ovarico comporta la non formazione dello stigma con conseguente anovulazione. Non va comunque dimenticato che la loro formazione può derivare da disordini della funzione gonadotropica a livello ipotalamico e/o ipofisario. Queste formazioni, contrariamente al c.i. cistico, frequentemente persistono, prolungando il periodo interestrale.

*I corpi lutei* riscontrati in concomitanza di patologie quali piometra, complesso idrometra/mucometra, ritenzione di feti morti, aplasia uterina o isterectomia, pur in assenza di anamnesi, si possono considerare verosimil-

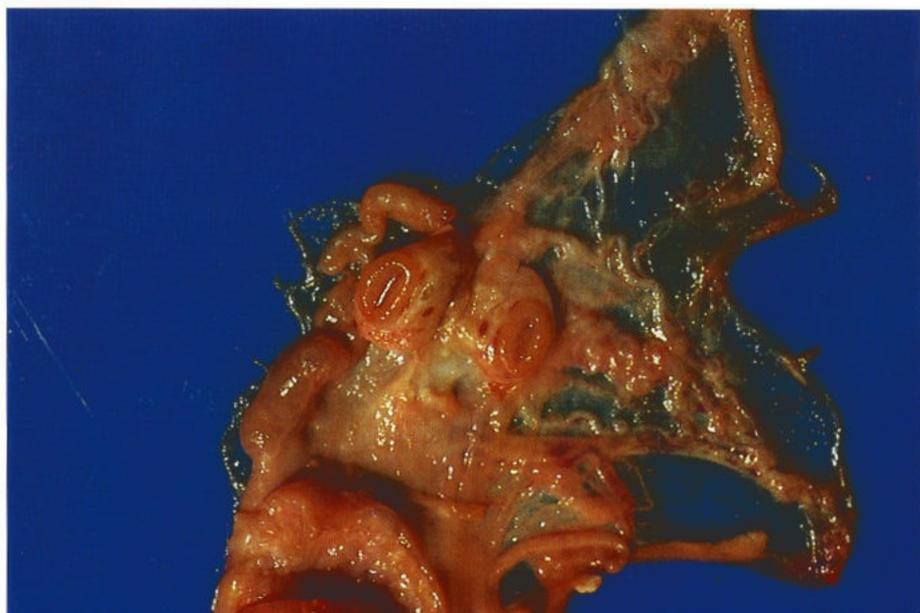


Foto 1 - Cisti luteinica e periovarite.

mente *persistenti*: tali condizioni interferiscono infatti sulla regolazione della funzionalità del c.l. da parte dell'utero tramite le prostaglandine (PGF $2\alpha$ ).

Rare sono invece risultate, nel complesso, le lesioni infiammatorie (*ovariti, periovariti*), le *cisti follicolari* (foto 2) e le *malformazioni*.

#### BORSA OVARICA E SALPINGE

Sporadiche sono risultate le anomalie a carico di questi tratti. *Melanosi/pseudomelanosi* e *cisti paratubariche* non limitano la capacità riproduttiva. Causa di ipofecondità, come sopra accennato, possono essere invece *C. tenuicollis* in localizzazione paratubarica e le *cisti salpingee*, di diametro fino a 5 mm, capaci di ostruire il lume dell'organo (foto 3-4). L'*idrosalpinge*, le *salpingiti* e le *aderenze ovarico-bursali* sono in genere bilaterali e concomitanti a lesioni di altri tratti.

#### UTERO E CERVICE

Appare evidente, dall'esame della tabella n° 4, che la patologia uterina è rappresentata con maggior frequenza dalle *lesioni a carattere infiammatorio* e che le flogosi *catarrali* dell'endometrio prevalgono su quelle *catarral-purulente* e *purulente*. Talvolta, per il progressivo coinvolgimento di tutti gli

strati della parete uterina, il processo infiammatorio si estende al perimetrio, con sviluppo di aderenze e di lesioni ascessuali, spesso diffuse a vari tratti dell' apparato genitale, compresi i legamenti larghi.

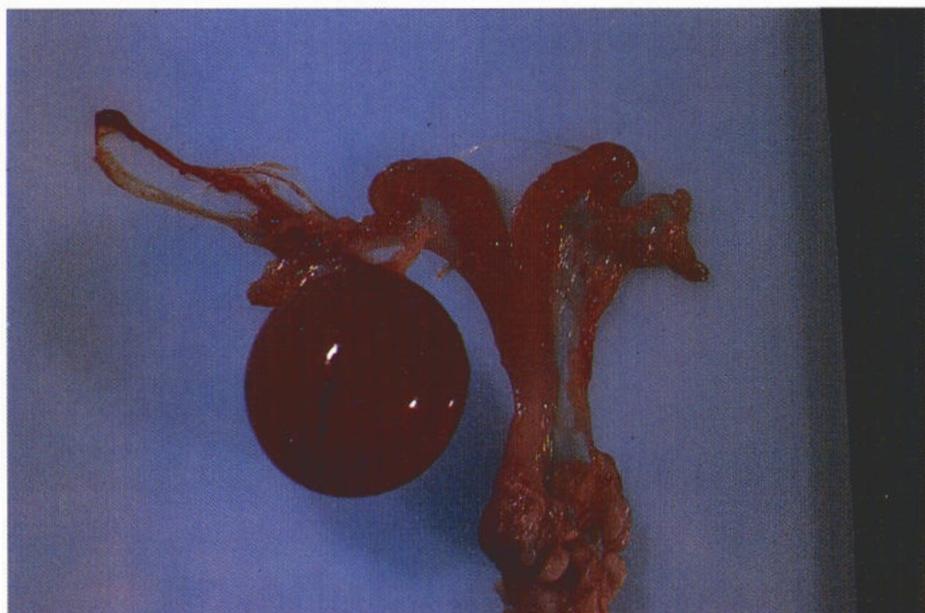


Foto 2 - Agnella di 1 mese di età, cisti follicolare.

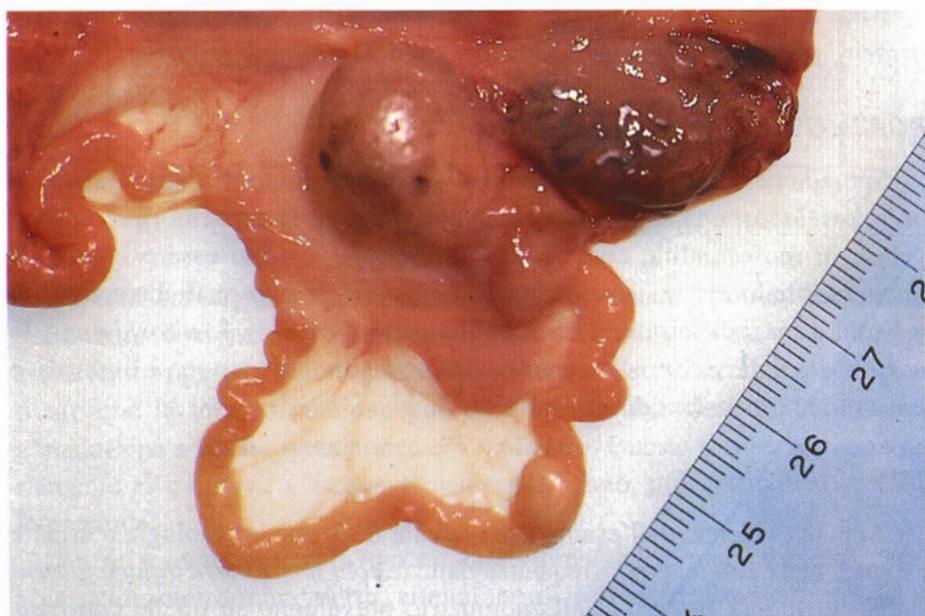


Foto 3 - Cisti salpingea ostruente.

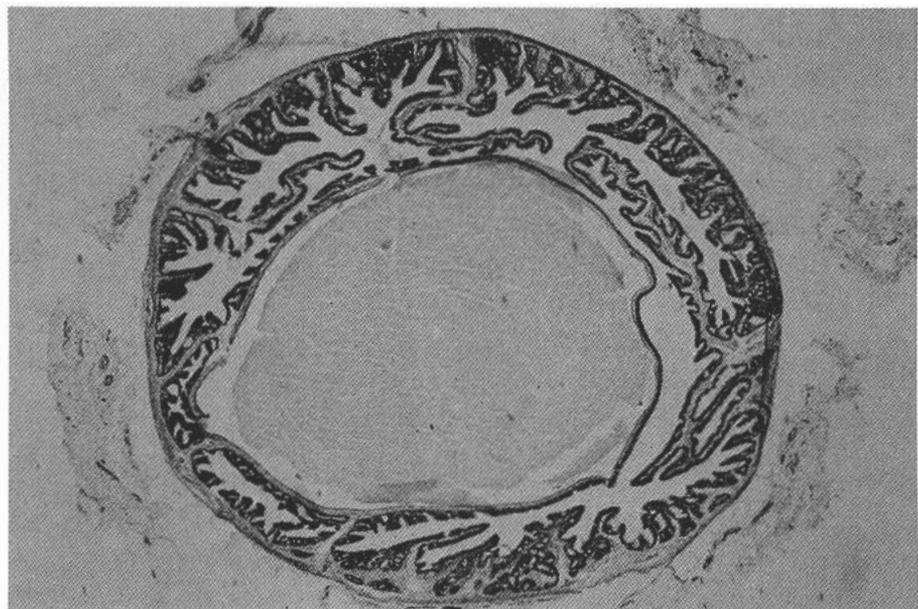


Foto 4 - Cisti salpingea ostruente.

La perimetrite è inoltre una comune complicanza di interventi ostetrici (taglio cesareo) (foto 5).

Indipendentemente dall'eziologia, nel nostro studio è stata osservata una discreta frequenza della patologia in gravidanza. In particolare è stata riscontrata una predominanza dei casi di morte *embrionale* o *fetale* (foto 6) nel primo terzo del periodo gravidico. Essi sono svelati, nella maggioranza dei casi, dal riscontro di resti in macerazione del prodotto del concepimento o, dopo la loro espulsione, di alterazioni degenerative-necrotiche delle caruncole (foto 7). Seguono i casi di morte e ritenzione fetale nell'ultimo terzo della gravidanza. Gli esiti della mancata espulsione sono la *mummificazione* o la *macerazione del feto*. La prima possibilità si riscontra, in genere, quando la morte del feto non è addebitabile a germi causa di lisi e la cervice resta chiusa impedendo l'inquinamento per via ascendente della cavità uterina. Tuttavia nei feti a termine, con apparato digerente già dotato di idoneo corredo enzimatico, la macerazione fetale può essere l'esito di un processo di auto-digestione che, partendo dagli organi della cavità addominale, si estende ai tessuti circostanti. La macerazione, se di origine settica, è un fenomeno che attiva violenti processi infiammatori, caratterizzati da una metrite purulento-icorosa, che può portare a necrosi e rottura della

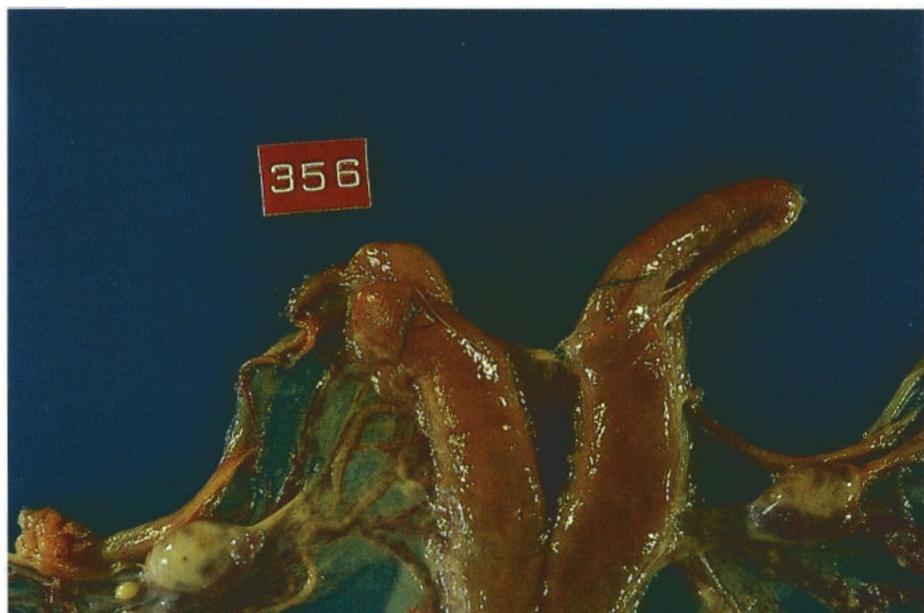


Foto 5 - Perimetrite da taglio cesareo: in evidenza la sutura non appropriata.



Foto 6 - Morte fetale al primo terzo di gravidanza.



- Foto 7 - Residui placentari e necrosi delle caruncole a seguito di aborto precoce.

parete uterina o, nei casi cronici, a metaplasia squamosa dell'endometrio.

*Feti a termine in via di mummificazione*, con gli annessi adesi all'epiploon, sono stati riscontrati nella cavità addominale di 2 ovini. L'esame dell'utero ha evidenziato fenomeni cicatriziali esito della rottura della parete uterina e/o cervicale.

Nella nostra indagine sono stati complessivamente riscontrati 3 casi di *malformazione* dell'apparato genitale: di questi uno risultava contraddistinto da agenesia ovarica, aplasia segmentaria delle salpingi, della cervice e della vagina ed i restanti da pseudoermafroditismo di tipo maschile (foto 8). Questi ultimi da un punto di vista morfologico erano caratterizzati da genitali esterni di tipo femminile (vulva e vestibolo con clitoride ipertrofico) mentre le gonadi, contenute all'interno di un processo vaginale e rappresentate da testicoli ipoplasici, trovavano collocazione nel sottocute della regione inguinale al di sotto del parenchima mammario; da ambo i lati erano presenti epididimo, deferente, ampolla del deferente e vescichetta seminale.

Anche le pigmentazioni della mucosa uterina (*melanosi* o *pseudomelanosi*) sono state riscontrate con discreta frequenza (1,10%), superiore a quella rilevata nelle salpingi (0,68%), e ancor più rispetto alla melanosi cervicale (0,17%).

Nella cervice predominano invece i processi flogistici (0,93%) spesso acuti e in relazione con quelli uterini. Piuttosto frequenti gli esiti dei traumatismi legati al parto, di comune osservazione nella pecora a fine carriera e caratterizzati dall'interruzione delle pliche e talvolta dalla presenza di estesi fenomeni cicatriziali.

### VAGINA, VESTIBOLO E VULVA

Non è stato possibile il controllo sistematico su tutti gli apparati in quanto, la rapidità dei tempi di macellazione, comportava spesso un prelievo incompleto di questi distretti. Tuttavia nel corso della ricerca è stata rilevata la presenza di: ossa e residui fetali in vagina (foto 9), corpi estranei (*forasacchi*), lesioni traumatiche da parto, processi flogistici (spesso cronici) e cisti delle ghiandole vestibolari.

### LEGAMENTI LARGHI

Oltre agli esiti di processi infiammatori uterini ed ovarici, spesso caratterizzati da sequestro di raccolte purulente e da fenomeni aderenziali, va segnalato il frequente riscontro, mono/bilaterale, di lesioni vascolari. Più in particolare sono stati osservati n° 10 casi di trombosi, in prevalenza dell'arteria uterina media (foto 10 -11), e n° 8 casi di fibrosi e calcificazione, soprattutto dell'arteria ovarica (foto 12).

### PATOLOGIA NEOPLASTICA

Un solo caso di adenocarcinoma tubulare è stato osservato a carico di ovaio, salpinge e corno uterino omolaterali, con metastasi al legamento largo coinvolgenti anche l'uretere. Insieme a detta neoplasia si osservava trombosi a carico dell'arteria ovarica dello stesso lato.



Foto 8 - Pseudoermafroditismo maschile ("free-martin"): vulva ipoplasica e testicoli con epididimo e deferenti.



Foto 9 - Feto macerato in vagina.



Foto 10 - Trombosi dell'arteria uterina.



Foto 11 - Trombosi dell'arteria uterina.

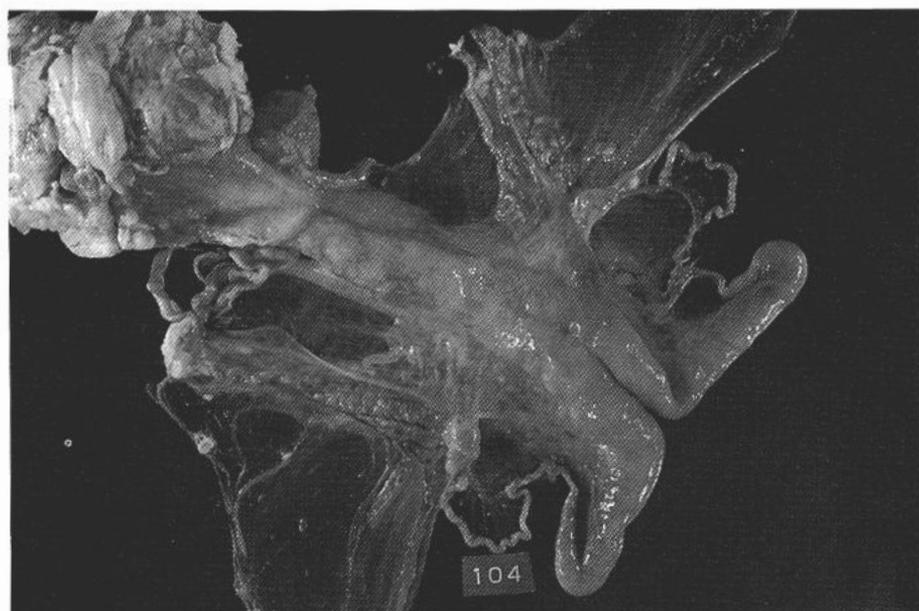


Foto 12 - Fibrosi calcifica dell'arteria ovarica.

### *CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI*

L'esame anatomico-patologico dell'apparato genitale degli ovini regolarmente macellati offre una buona panoramica sulle varie patologie nel loro complesso, ma la consistenza rilevata è verosimilmente solo la punta di un iceberg. Oggetto del nostro studio sono stati infatti animali riformati prevalentemente per mastiti o per vecchiaia; di conseguenza sono sfuggiti all'osservazione la maggior parte degli aborti e delle patologie post-partum che spesso si risolvono anche spontaneamente.

I nostri risultati rispecchiano sostanzialmente quanto già noto: razza, alimentazione, conduzione aziendale, trattamenti ormonali ecc., sono tutti fattori in grado di influire nettamente sulle diverse percentuali di riscontro delle lesioni dell'apparato genitale femminile nell'ovino. Le cisti ovariche, ad esempio, risultano nell'ovino sardo assai più rare rispetto a quanto osservato nelle pecore allevate in Piemonte.

Relativamente alle cisti luteiniche conseguenza di periovarite, è probabile che, nel sospetto di formazioni luteiniche attive, l'eventuale trattamento con prostaglandine possa risultare infruttuoso ai fini del recupero riproduttivo, soprattutto se il fenomeno infiammatorio interessa entrambe le ovaie.

In merito ad altro tipo di alterazioni va inoltre sottolineato che il caso di

idrometra/mucometra da noi osservato era di lieve entità e non chiaramente riferibile all' affezione nota come pseudo-gravidanza.

Le lesioni infiammatorie dell'utero sono risultate, nel complesso, la più frequente causa di ipofecondità; tali alterazioni erano per lo più conseguenti a gravidanza o aborto e potevano essere concomitanti a presenza di corpo luteo (persistente o ciclico). La terapia delle flogosi uterine dovrebbe pertanto comprendere l'utilizzo delle PGF2 $\alpha$  poiché la luteolisi e lo stato di estro che spesso segue, facilitando l'eliminazione dell'essudato e migliorando le difese immunitarie locali, accelerano i processi di guarigione. Va d'altra parte considerato che questi processi infiammatori sono talvolta associati a salpingite, idrosalpinge e/o aderenze ovarico bursali che complicano o addirittura impediscono il recupero funzionale.

Il riscontro in cavità addominale di feti a termine, in via di mummificazione e completi di invogli, vista l'assenza di idoneo rapporto tra i cotiledoni ed i tessuti attigui, è riferibile, non a una "gravidanza extrauterina" p.d., ma piuttosto alla semplice rottura dell'utero durante il parto. I fenomeni cicatriziali che ne derivano spesso esitano in stenosi settoriali dell' utero e/o della cervice.

Similmente, in merito alla presenza di resti del prodotto del concepimento in vagina, riteniamo che essa derivi dalla mancata espulsione del feto e dei suoi invogli (parto o aborto incompleto), seguita da macerazione e ritenzione delle ossa. In questi casi - come confermato anche all'esame istologico - l'utero può peraltro presentarsi in normali condizioni; nei soggetti con tale patologia, non è pertanto da escludere la completa ripresa della capacità riproduttiva qualora i resti fetali venissero allontanati. Da segnalare piuttosto che il permanere in vagina di tali residui, non ostacolando la ripresa dei cicli, può essere causa di lesione traumatica nell'ariete durante l'accoppiamento.

La presenza di imponenti lesioni nelle arterie uterine e ovariche è il dato più interessante finora scaturito; in particolare l'interpretazione delle estese formazioni trombotiche, apparentemente di origine non batterica, pone molti quesiti sia sulla possibile eziologia che sulle eventuali ripercussioni negli organi irrorati da tali vasi. L'elevata frequenza di dette lesioni nell' ovino sardo impone tuttavia di accertare se si tratti di alterazioni vascolari primarie o se invece non conseguano a processi reattivi dei vari tratti dell' apparato genitale.

Viene confermata infine la rarità, nella specie ovina, delle neoplasie e delle malformazioni. Fra queste ultime si segnala tuttavia l'esistenza di casi

riferibili al “free-martinismo” del bovino.

Concludiamo rilevando che nel complesso solo 76 apparati genitali ( con esclusione di quelli sede di lesioni vascolari al legamento largo ) - pari al 6,46% di quelli esaminati - presentavano alterazioni causa di ipofecondità o sterilità.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Adams N.R. (1975)-*A pathological and bacteriological abattoir survey of the reproductive tracts of merino ewes in Western Australia.* Austr. Vet. J., 51, 351.
- 2) Anderson L.J., Sandison A.T. (1969) - *Tumours of the female genitalia in cattle, sheep and pigs found in a British abattoir survey.* J. Comp. Path., 79, 53
- 3) Ansari H. (1978) - *Etude des conditions fonctionnelles et pathologiques des organes genitaux des brebis a Teheran.* Revue Méd. Vét., 129, 285.
- 4) Arthur G.H. (1956) - *Data on sheep reproduction derived from abattoir material.* J. Comp. Path., 66, 345.
- 5) Biolatti B., Guarda F., Pau S. (1984) - *Sulla patologia dell'apparato genitale femminile di ovini regolarmente macellati.* SUMMA, 1, 31.
- 6) Biolatti B., Pau S., Appino S. (1991) - *Patologia dell'apparato genitale femminile degli ovini e caprini.* Atti Pfizer, 11, 15.
- 7) Emady M., Noakes D.E., Arthur G.H. (1975) - *Analysis of reproductive function of the ewe based on post mortem examination.* Vet. Rec., 23, 175.
- 8) Lesbournes G., Lagneau F. (1951) - *Gestations extrautérines.* Rec. Méd. Vét., 127, 257.
- 9) Long S.E. (1980) - *Some pathological conditions of the reproductive tract of the ewe.* Vet. Rec., 23, 175.
- 10) Sokkar S.M., Kubba M.A. (1980) - *Pathological studies on the fallopian tubes of ewes.* Zbl . Vet. Med. A., 27, 118.
- 11) Wilkes P.R. (1978) - *Studies on a sheep freemartin.* Vet. Rec., 18, 140.