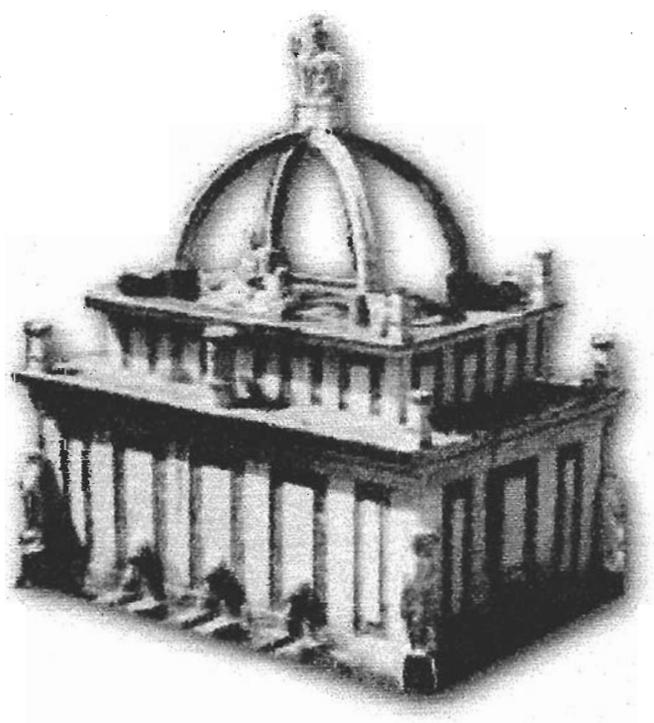


APIV
UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI SASSARI
ORDINE DEI MEDICI VETERINARI DELLA PROVINCIA DI SASSARI
I.Z.S. DELLA SARDEGNA "G.PEGREFFI"
ASVAC

ATTI DEL XVII CONVEGNO DELL'ASSOCIAZIONE ITALIANA DEI PATOLOGI VETERINARI



Sassari, 26-27 marzo 1999

ATTI MEETING APIV PRIMAVERILE 1999

SASSARI, 26-27 MARZO 1999

ELENCO DELLE COMUNICAZIONI ORALI

| | |
|---|----|
| INDAGINI CLINICO-PATOLOGICHE IN UN FOCOLAIO DI PMWS (POSTWEANING MULTISYSTEMIC WASTING SYNDROME) IN NORD ITALIA Marcato P.S., Sidoli L., Mandrioli L., Della Salda L., Cerati C., Rolla G.L. | 4 |
| OSSERVAZIONI SU DUE CASI DI SCRAPIE IN CAPRE DELLA PROVINCIA DI REGGIO-EMILIA Gelmetti D., L. Gibelli, L. Capucci, I. Barbieri, M.Tamba, M. Dottori, G. Cammarata | 14 |
| INFEZIONE DA <i>Dermatophilus congolensis</i> NEL CAMOSCIO. SEGNALAZIONE DI DUE CASI Sironi G., Grilli G., Citterio C., Sala M., Vallone L., Finazzi M. | 19 |
| UN CASO DI LEUCEMIA ACUTA IN UN CAVALLO Roccabianca P., Castagnaro M., Giuliani A. | 23 |
| DIAGNOSTICA INTRAVITALE E POSTMORTALE DELLA PERITONITE INFETTIVA FELINA Paltrinieri S. | 27 |
| ENCEFALO-RETINOPATIA VIRALE (VNN) IN STADI GIOVANILI DI BRANZINO (<i>D. labrax</i>) IN ASSENZA DI LESIONI TIPICHE DI VACUOLIZZAZIONE CELLULARE Galeotti M., Beraldo P., Patarnello P., Sarli G., Volpatti D. | 32 |
| MICROMETASTASI LINFONODALI NEI TUMORI MAMMARI MALIGNI DELLA CAGNA Sarli G., Berton D., Benazzi C., Galeotti M., Marcato P.S. | 39 |
| VALUTAZIONE COMPARATIVA DI MARKERS IMMUNOISTOCHEMICI PER LA DIAGNOSI DI MESOTELIOMA IN ANIMALI DOMESTICI Grieco V., Gelmetti D., Solimene N., Parodi M. | 45 |
| INDAGINI IMMUNOISTOCHEMICHE SULLE PROTEINE DEL CITOSCHELETRO IN MAMMELLE FELINE NORMALI, IPERPLASTICO/DISPLASTICHE E NEOPLASTICHE Sironi G., Faustino A.M.R., Montemezzo N., Veronesi M.C., Mollo A., Mandelli G. | 49 |
| EVIDENZIAMENTO IMMUNOISTOCHEMICO DELLA PROTEINA p53 IN ALCUNI ANIMALI DOMESTICI. PROVE TECNICHE COMPARATIVE Riccaboni P., Sironi G. | 54 |
| COMPLESSO IPERTROFIA MAMMARIA-FIBROADENOMA DEL GATTO: ASPETTI ANATOMO-ISTOPATOLOGICI ED OSSERVAZIONI IMMUNOISTOCHEMICHE Pirino S., Pau S., Zedda M.T., Sanna E., Leoni A., Nieddu A.M., Mura A., Bronzini R. | 60 |
| IL SEMINOMA NEL CAVALLO. STUDIO RETROSPETTIVO ED ESPERIENZA CLINICA Sanna Passino E., Careddu G.M., Cherchi R., Pirino S., Muzzetto P. | 65 |

INTOSSICAZIONE DA CARBAMMATI NEL CANE: OSSERVAZIONI
IMMUNOISTOCHEMICHE E RILIEVI TOSSICOLOGICI

Perillo A., Luppi A. 71

CARATTERIZZAZIONE DEL “PROFILO ISTOLESIVO” NEL MIDOLLO SPINALE DI OVINI
CON SCRAPIE NATURALE

Ligos C., Bozzetta E., Sardo D., Casalone C., Di Guardo G., Agrimi U., Arru C., Caramelli M. ... 76

RILIEVI ISTOLESIVI IN SUINI ESPOSTI AD UN CEPPO VACCINALE GENETICAMENTE
MODIFICATO DELLA PSEUDORABBIA

Cantoni A.M., Ferrari M., Corradi A., Lazzari R., Cabassi E.

INDAGINI CLINICO-PATOLOGICHE IN UN FOCOLAIO DI PMWS (POSTWEANING MULTISYSTEMIC WASTING SYNDROME) IN NORD ITALIA

Marcato P.S.¹, Sidoli L.³, Mandrioli L.¹, Della Salda L.², Cerati C.⁴, Rolla G.L.⁵

¹ Dipartimento S.P.V.P.A., S.S.-D. Patologia Generale e Anatomia Patologica.
Facoltà di Medicina Veterinaria. Università di Bologna

² Facoltà di Medicina Veterinaria. Università di Teramo

³ Ex direttore della sezione di Parma dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia

⁴ Libero professionista

⁵ Pig Service. Fossano (CN)

Riassunto

In un focolaio di sindrome multisistemica del deperimento postsvezzamento (PMWS = *Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome*), individuato presso un allevamento "high health" di 1100 scrofe nel Nord Italia, sono state condotte indagini clinico-patologiche ed un approfondimento della patogenesi mediante ricerche istopatologiche, ultrastrutturali e microbiologiche. I sintomi si sono manifestati nel 10-40% dei suinetti svezzati al raggiungimento delle 6-8 settimane di età, con mortalità che in certi gruppi ha raggiunto punte del 12-14%. Gli animali ammalati presentavano uno stato di nutrizione scadente, altri erano francamente emaciati e tale condizione si realizzava nel corso di pochi giorni, dopo la comparsa dei sintomi rappresentati da grave prostrazione, tosse produttiva e non, grave dispnea-polipnea, pallore cutaneo, tumefazione rilevante dei linfonodi inguinali superficiali, ipertermia (40,8-41,5 °C), ittero (10%), poliartrite (15%). Una linfadenite generalizzata macrofagico-epitelioide con espressioni granulomatose ed una polmonite interstiziale multifocale sono risultate le lesioni dominanti e costanti nel quadro morboso, in cui erano frequenti anche manifestazioni infiammatorie interstiziali nel fegato (76%), nei reni (69%) e nel miocardio (53%) ed essudative nelle membrane sierose (polisierosite sierofibrinosa: 30%). L'indagine istologica ed ultrastrutturale sulle lesioni linfonodali ha evidenziato corpi inclusi tipici dell'infezione da *circovirus* nel 30% dei casi. Mediante PCR test nelle lesioni polmonari si è riscontrata la presenza di *PRRSV* in 12/14 casi (87%) e di *circovirus* tipo II in 4/5 casi (80%). Nella patogenesi della malattia appare centrale e decisivo lo stato di immunodepressione indotto dalle gravi alterazioni degli organi e tessuti linfopoietici.

Abstract

A new disease syndrome (PMWS = Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome) has been recognized since november 1998 in a 1100-sow "high health" one-site farrow-to-finish swine farm in Northern Italy. Young pigs, 6-8 week old, had weight loss, tachypnea-dyspnea, pallor, fever, jaundice (10%), and postweaning mortality rate peaked at 12-14%. Lesions consisted of enlarged lymph nodes with lymphoid tissue replaced by macrophage-epithelioid cells, multifocal interstitial lymphocytic-macrophagic pneumonia, interstitial hepatitis (76%), nephritis (69%) and myocarditis (53%), polyserositis (15%). Cytoplasmic inclusion bodies typical of *circovirus* were demonstrated by histology and electron microscopy in macrophages in association with lymphadenitis in 4 of 12 affected pigs. Twelve of 14 lungs with pneumonia were positive for porcine respiratory and reproductive virus (PRRSV) (PCR test). Four of 5 lung samples were also positive for *circovirus* (PCV) type II (PCR test). Central to the disease pathogenesis seems to be a virus-induced extensive lymphoid tissue destruction with immunosuppressive effect.

INTRODUZIONE

La sindrome multisistemica del deperimento postsvezzamento (PMWS = *Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome*) è una malattia dei suini individuata per la prima volta nel 1991 in Canada, dove successivamente è stata anche studiata e correlata ad un'infezione da *circovirus* (Harding, 1996; Harding e Clark, 1998). Attualmente è segnalata, oltre che in Canada (province dell'Ovest e provincia di Quebec), negli USA (Stati della California, dell'Indiana e dell'Iowa) (Brodersen, 1998; Allan et al., 1998b), in Spagna (Segalés et al., 1997) e in Irlanda (Kennedy et al., 1998). Non risultano finora segnalazioni di PMWS in Italia. Una sindrome simile (*Dépérissement fatal du porcelet en fin de postsevrage*) è stata segnalata in Francia (Albina et al., 1996).

Le manifestazioni cliniche della PMWS iniziano all'età di circa 40 giorni e la sintomatologia più significativa è rappresentata principalmente da deperimento, dispnea e ittero (Harding e Clark, 1997). La PMWS si presenta con andamento epidemico oppure come malattia cronica endemica con elevata mortalità dei soggetti colpiti. La morbilità postsvezzamento va dall'8-10% fino al 50% (Suh et al., 1998). L'eziologia è attribuita ad un *circovirus*, essendosi dimostrato un elevato grado di associazione tra un ceppo virulento di *circovirus* (PCV tipo II) e la PMWS con la microscopia elettronica, l'immunoistochimica con anticorpi monoclonali, l'ibridizzazione in situ per identificare il genoma virale e il PCR test (Ellis et al., 1998; Balasch et al., 1998). La malattia è inoltre stata riprodotta sperimentalmente in suinetti gnotobiotici (comunicazione al XXX Meeting annuale della American Association Swine Practitioners, 27 febbraio – 2 marzo 1999). Il periodo d'insorgenza della PMWS nei suinetti (5-6 settimane d'età) corrisponde al momento in cui scompaiono gli anticorpi materni anti-PCV (Suh et al., 1998). Lo stress del parto rende le scrofe più vulnerabili all'infezione da PCV (Hines et al., 1995).

La malattia viene diagnosticata con maggior frequenza in allevamenti "high health", esenti dalle più comuni malattie infettive suine (polmonite enzootica, dissenteria suina, rinite atrofica), ma non necessariamente dall'infezione da PRRSV (*Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus*) (Ellis et al., 1998). Talvolta si riscontrano contemporaneamente casi sporadici di PDNS (*Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome*) e di polisierosite (Nayar et al., 1997; Segalés et al., 1998c). Sono state rilevate infezioni secondarie da criptosporidi (Harding e Clark, 1997), da *Pneumocystis carinii* (Clark, 1997), da agenti virali (PRRSV), batterici (*Pasteurella multocida*, *Haemophilus* sp., *E. coli*, *Streptococcus* α -emol., *A. pyogenes*) e da *Mycoplasma* (Mc Learn, 1998).

Le lesioni predominanti si trovano regolarmente nei tessuti linfoidi e nei polmoni, ma sono registrate in certi casi anche lesioni renali ed epatiche. L'antigene virale è stato dimostrato nei tessuti linfoidi, dove compare primariamente in cellule di zone B-dipendenti, e in vari organi compresi i polmoni, il fegato e i reni (Ellis et al., 1998). Il virus infetta i macrofagi, i linfociti, le cellule endoteliali ed epiteliali (Morozov et al., 1998). Almeno negli stadi tardivi della malattia il PCV si replica anche negli epatociti (Segalés et al., 1998a). Nei polmoni si può dimostrare contemporaneamente l'antigene del PRRSV in circa la metà dei casi (Ellis et al., 1998). D'altronde il PCV è stato isolato contemporaneamente al PRRSV in casi di SAMS (*Swine Abortion and Mortality Syndrome*) detta anche "PRRS atipica" (Halbur et al., 1998). L'esame post mortem è indispensabile per una diagnosi orientativa di PMWS in allevamento e l'esame istopatologico con l'evidenziazione dei corpi inclusi è richiesto per la diagnosi definitiva (Harding e Clark, 1997).

Recentemente, a partire da novembre 1998, abbiamo constatato numerosi casi di una malattia PMWS-simile in suinetti di un allevamento della Lombardia. Ne diamo una preliminare descrizione con particolare riguardo ai reperti che hanno consentito la diagnosi definitiva.

MATERIALI E METODI

Nel corso di interventi diagnostico-clinici presso un'azienda che presentava casi sospetti di PMWS, sono stati selezionati 30 suinetti ammalati dell'età di 7-8 settimane che sono stati soppressi con tanax e sottoposti a necropsopia. Tutti gli animali provenivano dallo stesso allevamento a ciclo chiuso di 1100 scrofe, situato in Lombardia. Fissazione di campioni di vari tessuti (13 casi: linfonodi, milza, tonsille, esofago, trachea, polmoni, cuore, stomaco, intestino, omento, fegato, cistifellea, pancreas, reni, surreni, vescica, cervello e cervelletto, midollo osseo) in formalina di Carson e di tessuto linfonodale in glutaraldeide. Inclusione in paraffina e colorazione istologica con Ematossilina-Eosina (E-E), in alcuni casi con P.A.S. Inclusione in resina, sezioni semifini (colorate con Blu di Toluidina) e sezioni ultrafini di tessuto linfonodale per osservazioni in microscopia elettronica a trasmissione (TEM). Mediante reazione a catena della polimerasi (PCR = *Polymerase Chain Reaction*), ricerca del PCV da campioni di polmone, del PRRSV e del virus di Aujeszky da campioni di polmoni, tonsille, cervello e da siero. Esame batteriologico su campioni di polmoni, fegato, reni, linfonodi, articolazioni.

RISULTATI

Sintomatologia clinica

La malattia è comparsa durante i mesi estivi del 1998 in un allevamento a ciclo chiuso di 1100 scrofe dell'Italia settentrionale. I sintomi si sono manifestati sempre nel 10-40% dei suinetti svezzati al raggiungimento delle 6-8 settimane di età, con mortalità che in certi gruppi ha raggiunto punte del 12-14%. Le indagini eseguite erano state indicative di una sindrome respiratoria cronica (polmonite enzootica) mentre le terapie di massa ed individuali eseguite sui gruppi colpiti non avevano avuto che modesti risultati.

Nel mese di novembre 1998 uno di noi è stato invitato a contribuire al raggiungimento di una diagnosi eziologica più rigorosa. Nei dati raccolti dall'allevatore per costruire una precisa anamnesi remota e recente spiccava il riferimento ad una sindrome respiratoria decisamente "anomala", con ciò intendendo che nella sua lunga esperienza non aveva mai riscontrato una condizione così grave nei suini della sua azienda.

Le manifestazioni cliniche più evidenti erano rappresentate da grave prostrazione, tosse produttiva e non, animali in stazione o in decubito sternale con grave dispnea-polipnea, alcuni con

respiro a bocca aperta. Molti suinetti stavano raggruppati a mutuo contatto, mentre erano visibili animali itterici (10%) ed altri con cute pallida come per anemia acuta. Si constatava ipertermia (40,8-41,5 °C). Presenti, ma rare, feci sciolte, non emorragiche. Gli animali ammalati presentavano uno stato di nutrizione scadente, altri erano francamente emaciati. Ciò avveniva nel corso di pochi giorni, dopo la comparsa dei sintomi.

Dopo una prima identificazione delle lesioni eseguita su animali morti spontaneamente o sacrificati mediante eutanasia (Tanax), il quadro indirizzava verso un grave sospetto di infezione acuta da virus della sindrome riproduttiva e respiratoria suina (PRRSV), mentre alcuni quadri di linfoadenomegalia, specie degli inguinali superficiali, iliaci, sternali e mediastinici, l'ittero, alcune ulcere gastroesofagee ed il coinvolgimento degli apparati respiratorio e cardiocircolatorio e nel 15% dei casi anche delle articolazioni, imponevano il sospetto di sindrome multisistemica del deperimento postsvezzamento (PMWS = *Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome*).

Non potendo realizzare una nostra proposta di depopolamento temporaneo (2-3 settimane) dei reparti di svezzamento, abbiamo consigliato un piano di profilassi a mezzo antibatterici su tutti i suinetti delle sale parto onde ridurre la pressione batterica del periodo postsvezzamento. I risultati, ancorchè insufficienti, sono apparsi tuttavia ridurre l'incidenza dei danni.

Esami necroscopici

All'esame necroscopico dei 30 suinetti soppressi le lesioni più gravi sono riscontrabili costantemente nei linfonodi e nei polmoni, incostantemente nella milza e nel cuore.

I linfonodi appaiono aumentati di volume, talora in modo notevolissimo specialmente gli inguinali superficiali (fino a 7 × 4 × 3 cm), che mostrano edema ambraceo del tessuto circostante ed in sezione rivelano estese aree pallide biancastre o focolai irregolari grigio-opachi su fondo arrossato. Sono aumentati di volume considerevolmente anche i linfonodi mandibolari, sternali, meseraici e iliaci.

La milza rivela una lieve congestione e in quattro casi un volume almeno triplicato con estese lesioni marginali di necrosi confluyente grigiatra ed intervallati infarti marginali emorragici. In un altro caso la milza mostra sparsi noduli grigiastri necrotici di 1-2 mm di diametro. Il timo è atrofico.

I polmoni, non afflosciati, presentano la gran parte dei lobuli di colorito rosso-bruno chiaro uniforme e di consistenza tipo gommapiuma. Sono interessati costantemente anche i lobi caudali e le zone dorsali. Si evidenziano spesso emorragie petecchiali subpleuriche. I lobuli colpiti, in sezione, non mostrano aspetti acinosi e alla compressione gemono scarso materiale liquido dai bronchi recisi. E' presente in qualche caso un lieve ispessimento edematoso roseo del tessuto

interlobulare. In una minoranza di casi (10%) sono presenti nei polmoni anche lesioni cranioventrali simili a quelle della polmonite enzootica o ad impronta acinosa catarrale-purulenta.

Nel 30% dei casi le pleure sono sede di essudazione sierofibrinosa o fibrinosa o sierofibrino-emorragica. In tali casi anche le altre sierose manifestano lesioni infiammatorie: pericardite fibrinosa o siero-emorragica, peritonite sierofibrinosa, talvolta (15%) anche artrosinovite sierofibrinosa.

Nel cuore il grasso epicardico è interessato da atrofia gelatinosa; in un caso si evidenziano striature grigiastre nel miocardio ventricolare; in un altro caso il miocardio ventricolare è sede di focolai necrotico-emorragici.

Il fegato appare lievemente congesto, mostra qualche filamento di fibrina tra i lobi e in tre casi appare di colore pallido giallastro e moderatamente ingrossato. La parete della cistifellea è ispessita da edema. Il mesentere appare iperemico e moderatamente edematoso. I reni, oltre a un generale impallidimento, mostrano edema della parete del bacinetto e dell'ilo. Altri reperti: atrofia del timo, lieve congestione dei vasi delle meningi encefaliche.

Un solo animale nello stesso reparto presenta lesioni cutanee (papule eritematoso-emorragiche confluenti) e renali riferibili alla dermatite-nefrite o PDNS (*Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome*) precedentemente descritta da uno degli autori di questa nota (Marcato et al., 1997). Anche in questo animale i linfonodi ed in particolare gli inguinali superficiali sono notevolmente aumentati di volume.

Indagini istologiche

Linfonodi. Si rileva nella maggior parte dei casi l'atrofia o la scomparsa delle strutture follicolari linfatiche e la sostituzione-infiltrazione del tessuto linfatico con cellule mononucleate di aspetto monocitoide-macrofagico o di aspetto macrofagico-epitelioidi, queste ultime qua e là tendenti a riunirsi in noduli e a formare sincizi con ampio citoplasma e tre-quattro o più nuclei. I noduli epitelioidi si situano di solito nella zona centrale di follicoli atrofici. Il c.d tessuto diffuso o similmidollare ha una struttura molto lassa, contrariamente alla struttura alquanto serrata normale, ed è pervaso da numerosi macrofagi liberi. In tre casi le strutture linfatiche appaiono estesamente distrutte da necrosi. In quattro casi si rivelano corpi inclusi citoplasmatici nei macrofagi epitelioidi: corpi globulari rotondi omogenei intensamente colorati in rosso-violaceo scuro con E-E, in grigio-bluastro scuro con Blu di Toluidina, di diametro vario (all'incirca da 2 a 15 μ m), singoli o più spesso riuniti a grappolo. Il nucleo di alcuni macrofagi appare interamente occupato da un incluso rosso-violaceo.

Milza. Anche nel tessuto linfoide splenico sono scomparsi i follicoli e vi sono infiltrazioni estese di cellule mononucleate d'aspetto macrofagico. In quattro casi le strutture sono distrutte da necrosi coagulativa e da ampi focolai d'infarcimento emorragico. In un caso si notano sparsi focolai nodulari di necrosi.

Tonsille. L'atrofia o la scomparsa di strutture follicolari tipiche s'accompagna a infiltrazione di cellule macrofagiche.

In tutti i tessuti linfopoietici, oltre all'infiltrazione di macrofagi, si nota un aumento degli eosinofili.

Midollo osseo. Oltre a una decisa ipercellularità, si notano imponente monocitosi, discreta neutrofilia, numerose forme immature mieloidi. Sospetta sindrome mielodisplastica.

Polmoni. I setti alveolari sono ispessiti considerevolmente da edema e da infiltrazione di mononucleati (macrofagi e linfociti), mentre le cavità alveolari appaiono collabite o contengono materiale acidofilo velamentoso o finemente granuloso, macrofagi vacuolizzati e alcuni linfociti, raramente sincizi. In un caso alcuni macrofagi alveolari e sincizi mostrano occasionalmente inclusi citoplasmatici simili a quelli descritti nei macrofagi linfonodali. Aspetti di epitelizzazione alveolare sono visibili occasionalmente. I bronchioli sono vuoti o contengono epitelio desquamato e rari macrofagi; l'epitelio bronchiolare è spesso sollevato da infiltrazione edematosa. Manicotti costituiti da macrofagi e linfociti attorniano le piccole arterie. Il BALT è atrofico o in gran parte sostituito da cellule macrofagiche. Il tessuto interstiziale interlobulare è ispessito da una moderata infiltrazione edematosa in cui sono distinguibili numerosi macrofagi. In un caso l'infiammazione polmonare manifesta segni di estrema gravità con espressioni tipiche di una polmonite interstiziale acuta a membrane ialine. Focolai circoscritti di bronchiolo-alveolite granulocitaria e/o di alveolite fibrinosa a localizzazione cranioventrale costituiscono un reperto concomitante in alcuni casi.

Cuore. Il tessuto adiposo subepicardico presenta edema mucoide o è infiltrato di mononucleati. Il miocardio presenta in un caso focolai di degenerazione granulare basofila delle miofibre, in sette casi focolai di miocardite interstiziale linfocitaria e macrofagica. In un caso la miocardite s'accompagna a estesi focolai di necrosi coagulativa ai cui margini s'addensano leucociti degenerati.

Fegato. In dieci casi si osservano sparsi focolai di infiltrazione di mononucleati, prevalentemente macrofagi, negli spazi portalì e piccoli addensamenti delle stesse cellule all'interno dei lobuli. Gli epatociti esibiscono alterazioni regressive, che vanno dalla degenerazione vacuolare, con accumulo di materiale PAS-positivo nel citoplasma, alla necrosi centrolobulare. In due casi si nota la dissociazione delle lamine epatiche. In un caso sono presenti piccoli focolai disseminati

intralobulari di necrosi con accumulo di materiale fibrinoide. La parete della cistifellea è ispessita da edema. In un caso la mucosa della cistifellea appare fittamente infiltrata di mononucleati.

Nell'omento si osservano infiltrazioni perivasali di mononucleati.

Reni. Focolai di nefrite interstiziale a localizzazione prevalente nella corticale bassa con accumulo di elementi macrofagici e linfociti sono presenti in nove casi (9/13 = 69%). L'infiltrazione cellulare infiammatoria interstiziale è presente nella parete del bacinetto in tre casi e si accompagna ad iperplasia dell'epitelio. Si riscontra costantemente un lieve edema interlobulare e nella parete del bacinetto.

Surrene. Necrosi a focolai della midollare in due casi; infiltrazioni di mononucleati in un caso.

Intestino. Moderata infiltrazione di mononucleati d'aspetto macrofagico-epitelioidi nella propria della mucosa dell'ileo e del colon; s'accompagna ad aumento degli eosinofili; si nota anche atrofia dei follicoli linfatici della placca linfatica dell'ileo con infiltrazione di macrofagi epitelioidi, che in qualche caso compongono noduli granulomatosi; necrosi estesa del tessuto linfatico dell'ileo in un caso; presenza di criptosporidi nelle ghiandole del colon associata a necrosi epiteliale in un altro caso.

SNC. Iperemia delle meninigi cerebrali e cerebellari. In un caso meningite con infiltrazione di mononucleati. Altro caso con rari manicotti perivasali di mononucleati nella corteccia.

Microscopia elettronica a trasmissione di campioni di tessuto linfonodale

Si osservano diverse cellule di aspetto linfoblastico, con scarsi profili di reticolo endoplasmatico rugoso (RER) e abbondanti ribosomi, e cellule dendritiche contenenti uno o più corpi inclusi citoplasmatici ovoidali. Questi ultimi appaiono costituiti da aggregati, circondati da membrana singola, di particelle del diametro di 10-20 nm, fittamente stipate ed anche disposte in strutture paracristalline o semicircolari, e da materiale più finemente granulare. Tali aggregati appaiono frequentemente in stretto rapporto con addensati di poliribosomi o con cisterne del RER spesso dilatate. Le cellule endoteliali presentano frequentemente strutture reticolari microtubulari (MTS) come quelle che si rinvencono in associazione ad infezioni virali. In alcune cellule linfatiche tali strutture si osservano contemporaneamente ad inclusioni paracristalline. Molti linfociti presentano espressioni di fenomeni regressivi, come vescicole contenenti corpi mielinici, dilatazioni del RER e figurazioni di sequestro intracisternale. Sono inoltre in evidenza diversi macrofagi con perossisomi, lisosomi contenenti organuli degenerati e materiale finemente elettrondenso.

Indagini microbiologiche

Le indagini virologiche mediante reazione a catena della polimerasi (PCR) sul siero di 10 soggetti ammalati sono risultate positive per PRRSV in 7/10. Su cinque pool di tessuto polmonare

proveniente da 14 soggetti la PCR è risultata positiva per PRRSV in quattro pool corrispondenti a 12/14 polmoni. La ricerca del virus di Aujeszky è sempre risultata negativa anche dal cervello e dalle tonsille. Le indagini mediante PCR test hanno permesso di identificare un *circovirus* tipo II (PCV tipo II) in campioni di 4/5 polmoni.

Gli *esami batteriologici* hanno consentito l'isolamento da alcuni campioni di tessuto polmonare di *Pasteurella multocida*, *Haemophilus parasuis* e *Streptococcus suis* sp. Nessun isolamento è stato realizzato dalle lesioni di poliartrite e ciò potrebbe avvalorare, solo in linea di sospetto, una possibile partecipazione di *Mycoplasma hyosinoviae*.

DISCUSSIONE

La sindrome multisistemica del deperimento postsvezzamento (PMWS) è essenzialmente caratterizzata da dimagrimento, dispnea e linfadenomaglia (Harding e Clark, 1997) e dal punto di vista anatomopatologico da linfadenite macrofagico-istiocitaria e polmonite interstiziale grave (Kiupel et al., 1998), non costantemente da epatite, nefrite e miocardite interstiziale (Segalés et al., 1998b). Il reperto istologico di tipici corpi inclusi consente di confermare la diagnosi nel 50% dei casi (Clark e Harding, 1998). La malattia non è stata finora riprodotta sperimentalmente con un ceppo di *circovirus* (PCV tipo II) frequentemente identificato nei suinetti ammalati, ma alcuni ritengono che un ceppo virulento di PCV sia l'agente responsabile, anche se la patogenesi e la concomitanza di altre infezioni, come quella da PRRSV, richiedono ancora dei chiarimenti. Due casi sporadici di PDNS (*Porcine Dermatitis Nephropathy Syndrome*) denominata anche PIGD (*Porcine Immunocomplex Glomerulonephritis Dermatitis*), di cui è ritenuto responsabile il PRRSV, sono stati rilevati in concomitanza con la PMWS da Segalés et al. (1998c) e un caso è stato trovato anche da noi.

I casi descritti in questa nota presentano quadri anatomo-clinici sovrapponibili a quelli identificati in altri Paesi come essenziali per la diagnosi di PMWS (Clark e Harding, 1998; Segalés et al., 1998b; Kiupel et al., 1998). L'evidenziazione dei reperti microscopici ritenuti più caratteristici (linfadenite macrofagico-sinciziale con deplezione linfoide e formazione di granulomi epitelioidi, polmonite interstiziale intralobulare macrofagica, presenza in macrofagi di corpi inclusi citoplasmatici che contengono aggregati di particelle similvirali di 10-20 nm di diametro disposte anche in strutture paracristalline) e l'identificazione del PCV tipo II in campioni di polmoni mediante PCR test integrano gli elementi diagnostici indispensabili per la conferma di PMWS. Lo studio dei nostri casi ci ha inoltre consentito di confermare l'estensione di processi infiammatori del tipo c.d. interstiziale (linfocitario e macrofagico) ad organi, come il fegato, i reni (9/13 = 69%), il cuore (7/13 = 53%), che altri autori avevano precedentemente riscontrati affetti nella PMWS. In

particolare si conferma l'occorrenza frequente di un'epatite interstiziale (10/13 = 76%), che rappresenta una nuova acquisizione nel campo delle epatiti virali del suino, dopo quelle recentemente individuate ed attribuite al virus dell'epatite E (Meng et al., 1997) e al PRRSV (Halbur et al., 1998). Lievi espressioni di colite istiocitaria-eosinofila sono presenti in tutti i casi. Inoltre abbiamo messo in evidenza espressioni di flogosi non purulenta nel bacinetto renale (3/13), nella surrenale (1/13), nella trachea (1/13), nell'esofago (1/13), nelle meningi cerebrali (1/13) e nella corteccia cerebrale (1/13).

Il sovvertimento strutturale e il grave depauperamento linfocitario degli organi linfoidi, abbinato in alcuni casi a necrosi estese, rappresenta, insieme alla polmonite interstiziale multifocale, la lesione preminente e conferma l'ipotesi che nella PMWS l'infezione virale possa indurre nei suinetti un grave stato di immunodepressione (Segalés et al., 1998b) cui conseguono infezioni secondarie con lesioni infiammatorie specialmente delle sierose e dei polmoni.

BIBLIOGRAFIA

1. Albina E., Cariolet R., Eveno E. (1996): Premiers résultats du CNEVA sur le dépérissement fatal du porcelet en fin de postsevrage, Suppl. à Sem. Vet. 834, 1-2.
2. Allan G., Meehan B., Todd D., Kennedy S., Mc Neilly F., Ellis J., Clark G., Harding J., Espuna E., Botner A., Charreyre C (1998a): Novel porcine circoviruses from pigs with wasting disease syndromes. Vet. Record 142, 467-468.
3. Allan G.M., Mc Neilly F., Kennedy S., Daft B., Clarke E.G., Ellis J.A., Haines D.M., Meehan B.M., Adair B.M. (1998b): Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. J. Vet. Diagn. Invest. 10, 3-10.
4. Balasch M., Segales J., Plana-Duran J., Umiza A., Latimer K.S., Domingo M. (1998): Pathological findings of pigs experimentally inoculated with tissue homogenates from pigs clinically affected by post-weaning multisystemic wasting syndrome. Proc. 15th IPVS Congr., Birmingham, England, 5-9 July, 211.
5. Brodersen B.W. (1998): Overview of Post Weaning Multisystemic Wasting Syndrome. George A. Young Swine Conference, 21-24.
6. Brodersen B.W. (1998): Case presentations of PMWS. Swine Practitioner, October, 10-11.
7. Clark E.G. (1997): Post-weaning multisystemic wasting syndrome. Proc. Am. Assoc. Swine Pract. 28, 499-501.
8. Clark E.G., Harding J.C. (1998): The pathology of Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome. Proc. 15th IPVS Congr., Birmingham, England, 5-9 July, 212.
9. Ellis J., Hassard L., Clark E., Harding J., Allan G., Willson P., Strokappe J., Martin K., Mc Neilly F., Meehan B., Todd D., Haines D. (1998): Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. Can. Vet. J., 39, 44-51.
10. Halbur P.G., Sorden S.D., Lager K.M. (1998): Evaluation of the pathogenicity of "atypical PRRS" virus isolates in caesarean-derived-colostrum-deprived (CDCD) pigs. Proc. 15th IPVS Congr., Birmingham, England, 5-9 July, 136.
11. Harding J.C. (1996): Postweaning multisystemic wasting syndrome. Preliminary epidemiology and clinical findings. Proc. Western Can. Assoc. Swine Pract. 21.
12. Harding J.C.S., Clark E.G. (1997): Recognizing and diagnosing Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome. Swine Health and Prod. 5(5), 201-203.
13. Harding J.C.S., Clark E.G. (1998): PMWS: preliminary epidemiology and clinical presentation. Proc. 15th IPVS Congr., Birmingham, England, 5-9 July, 213.
14. Hines R.K., Lukert P.D., Dau D., Case D. (1995): Some effects of porcine circovirus on performance. Swine Health and Prod. 3 (6), 251-255.
15. Kennedy S., Allan G., McNeilly F., Adair B.M., Hughes A., Spillane P. (1998): Porcine circovirus infection in Northern Ireland. Vet. Record 142, 495-496.
16. Kiupel M., Stevenson G.W., Mittal S.K., Clark E.G., Haines D.M. (1998): Circovirus-like viral associated disease in weaned pigs in Indiana. Vet. Pathol. 35, 303-307.
17. Leman A. D. Swine Conference (1997): Case 7-8-9: PMWS, 5-6.

18. Marcato P.S., Zaghini L., Ingrà L. (1997): La glomerulonefrite-dermatite suina. Un nuovo modello animale di malattia umana. Atti SIPAS, XXIII Meeting Annuale, Verona, 379.
19. Mc Learnon J. (1998): Case report: Detection and confirmation of porcine circovirus infection by histopathology, electron microscopy and PCR in a pig exhibiting clinical signs and necropsy lesions consistent with Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome. *Am. Assoc. Swine Pract.*, 37-40.
20. Meng X.J., Purcell R.H., Halbur P.G. (1997): A novel virus in swine related to the human hepatitis E virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 9860-9865.
21. Morozov I., Sirinarumitr T., Sorden S.D., Halbur P.G., Morgan M.K., Yoon K.J., Paul P.S. (1998): Detection of a novel strain of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 36, 2535-2541.
22. Nayar G.P.S., Hamel A., Lin L. (1997): Detection and characterization of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *Can. Vet. J.* 38, 385-386.
23. Rossow K.D. (1998): Porcine circovirus: four cases and a historical review. Allen D. Leman Swine Conference, 5-9.
24. Segalés J., Sitjar M., Domingo M., Dee S., Del Pozo M., Noval R., De Las Heras A., Sacristán C., Ferro A., Latimer K.S. (1997): First report of post-weaning multisystemic wasting syndrome in Spain. *Vet. Rec.* 141, 600-601.
25. Segalés J., Domingo M., Balasch M., Plana-Duran J., Latimer K.S., Majò N. (1998b): Lesions and porcine circovirus genome detection in lymphoid tissues from post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) affected pigs. *Proc. 15th IPVS Cong., Birmingham, England, 5-9 July*, 210.
26. Segalés J., Domingo M., Balasch M., Plana-Duran J., Latimer K.S., Majò N. (1998a): Lesions and distribution of porcine circovirus genome in the liver from post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) affected pigs. *Proc. 15th IPVS Congr., Birmingham, England, 5-9 July*, 209.
27. Segalés J., Domingo M., Latimer K.S. (1998c): Porcine circovirus is present in cases of porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS). *Proc. 15th IPVS Congr., Birmingham, England, 5-9 July*, 215.
28. Suh D.K., Johnson C.S., Park B.K., Joo H.S. (1998): Seroepidemiology of porcine circovirus infection in midwestern U.S. swine farms. *Proc. 15th IPVS Congr., Birmingham, England, 5-9 July*, 214.

OSSERVAZIONI SU DUE CASI DI SCRAPIE IN CAPRE DELLA PROVINCIA DI REGGIO-EMILIA.

D. Gelmetti, L. Gibelli, L. Capucci, I. Barbieri, M. Tamba, M. Dottori, G. Cammarata*

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia- Brescia.

* Ist. di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia. Aviare-Università di Milano.

RIASSUNTO

Viene segnalato un caso di Scrapie diagnosticato in due capre appartenenti ad un allevamento ovi-caprino della provincia di Reggio Emilia. La diagnosi è stata perfezionata attraverso l'esame istologico dell'encefalo ed integrata dalla dimostrazione immunoistochimica e in western-blot della PrP^{sc}. Poichè nelle pecore conviventi non erano stati osservati sintomi neurologici sospetti, e poichè le capre erano vaccinate contro la agalassia contagiosa la diffusione jatrogena della malattia sembra molto probabile, analogamente a quanto potrebbe essere avvenuto in altri focolai verificatisi nel centro e nel sud Italia.

INTRODUZIONE

Il primo segnalamento di Scrapie naturale nelle capre è del francese Chelle nel 1942, mentre le prime descrizioni dettagliate della malattia, riprodotta sperimentalmente, sono riferite da Hadlow (1961) e da Zlotnik (1961). Successivamente ricercatori scozzesi (Brotherstone et al, 1968) hanno potuto dimostrare che giovani capre conviventi per lunghi periodi con pecore naturalmente malate di Scrapie potevano contrarre la malattia. Pur rimanendo la malattia più rara nelle capre che nelle pecore, ulteriori focolai di Scrapie in capre sono stati segnalati negli Stati Uniti (Hourrogan et al, 1969; Hadlow et al. 1980), nel Regno Unito (Harcourt and Anderson, 1974; Wood and Done, 1992; Wood et al, 1992; Andrews, 1992; Hadlow et al. 1980) ed in Francia (Perrin et al. 1991). In Italia la Scrapie naturale nelle capre è stata segnalata per la prima volta in 4 allevamenti siciliani ovi-caprini e in 4 greggi caprini pulgiesi dove è comparsa in modo improvviso e simultaneamente (Capucchio et al, 1998, CEA, 1997 comunicazione personale). Tuttavia, Andrews (1998) ed Agrimi et al (1999) sono dell'opinione che, data l'elevata incidenza riscontrata in breve periodo di tempo, sia più probabile trattarsi di infezione jatrogena. Data l'attenta sorveglianza dedicata a questa malattia in Europa si ritiene interessante segnalare la recente comparsa in un allevamento della provincia di Reggio Emilia ove la malattia era stata osservata sporadicamente nelle pecore ma mai nelle capre (Guarda et al., 1991; Perini, 1989 comunicazione personale).

MATERIALI E METODI

Sono state conferite alla sezione diagnostica di Reggio Emilia, in tempi successivi, due capre: un becco di circa 5 anni ed una capra di 3 anni. Il becco è stato trovato morto, in scadente stato di nutrizione, lungo l'argine di un fiume. La capra è stata soppressa in fase di avanzato decadimento

organico. L'allevamento di origine dei due animali è di tipo misto ovi-caprino costituito da circa 150 capre ibride e 500 pecore di razza sarda. Negli ultimi anni il pastore riferiva un aumento della mortalità (circa 30 capi nel biennio 1996-97) nelle capre adulte. La sintomatologia: dimagrimento, emaciazione e morte, non ha mai interessato gli ovini. Sintomi neurologici e turbe comportamentali erano assenti in entrambe le specie. L'indagine epidemiologica rilevava che nel 1990 erano state acquistate 150 pecore marchigiane rivelatesi affette da mastite da micoplasmi. In seguito a ciò, nel biennio 1991-92, è stata introdotta, oltre alla regolare vaccinazione contro le clostridiosi ed i periodici trattamenti antiparassitari, una vaccinazione contro l'agalassia contagiosa.

Esami di laboratorio

Gli organi (encefalo, polmone, fegato, milza e rene) sono stati sottoposti esame batteriologico secondo le metodiche di Carter (1994). Entrambi gli encefali e la tonsilla della capra sono stati avviati ad indagine istologiche-immunoistochimiche e di immunoblotting. Seguendo un protocollo interno d'intervento il materiale prelevato era suddiviso in due parti rispettivamente fissato in formalina tamponata al 10%, e conservato a -20°C.

Esami neuropatologici

Da sezioni coronali dello spessore di circa 1 cm sono stati ricavati campioni inclusi in paraffina delle aree dei nuclei della base, talamo, mesencefalo, ponte, cervelletto e midollo allungato. Da detti campioni sono state allestite sezioni di circa 5µm colorate con Ematossilina-Eosina (EE). Alle stesse colorazioni sono state sottoposte anche sezioni microtomiche di tonsilla palatina.

Colorazione immunoistochimica della PrP^{sc}

Sezioni seriate di 5µm dei campioni inclusi sono state sparaffinate, reidratate e sottoposte alla colorazione immunoistochimica con: 1) un MAb FH11 verso la PrP di pecora diluizione d'uso 1:500 (fornitoci dal dr. C.R.Birkett- Institute for Animal Health, Compton Laboratory), 2) un anticorpo policlonale prodotto a partire da un peptide sintetico costituito da 15 aminoacidi corrispondenti alla sequenza 97-111 della PrP di pecora diluizione d'uso 1:500 (Gelmetti et al., 1998).

La colorazione immunoistochimica è stata preceduta da un trattamento di unmasking mediante passaggio in fenolo 85% per 30 minuti, autoclave (pentola a pressione) in acqua distillata per 10 min., soluzione di guanidina tiocianato 2M per 2 ore. Successivamente le sezioni sono state 1) incubate a +4°C per una notte con i 2 anticorpi primari; 2) incubate con un sistema rivelatore streptoavidina-biotina utilizzando come cromogeno la 3-3' diaminobenzidina (DAB) (Sigma); 3) controcolorate con E-E per 5 min. I controlli erano rappresentati da: 1) siero di capra normale diluito 1:20 incubato sul campione in esame; 2) una sezione coronale di ponte encefalico negativo

per Scrapie, incubata con i sieri in esame opportunamente diluiti; 3) una sezione coronale di ponte encefalico positiva per Scrapie, incubata con i sieri in esame opportunamente diluiti.

Western Blotting

0,5 g di tessuto cerebrale e di tonsilla palatina sono stati omogeneizzati al 10% w/v in tampone di estrazione (100mM NaCl, 0,5% Nonidet P40, 0,5% Na-deossicolato, 10mM EDTA, 10mM Tris HCl, pH 7,4), sonicati e centrifugati a 2000 rpm per 5 min.. Aliquote degli omogenati sono stati bolliti per 5 min. in presenza di sample buffer (2% b-mercaptoetanololo, 1,5% SDS, 60mM Tris-HCl, pH 6,8, glicerolo 10%), separati mediante gel di poliacrilamide al 12% ed elettro-trasferiti su Immobilon P (Millipore). Dopo saturazione (1.5 h in 5% latte in polvere in phosphate buffered-saline) le membrane sono state incubate overnight a 4°C con un siero di coniglio anti PrP di pecora (sequenza aa 97-11). Dopo incubazione con l'anti-igG di coniglio coniugata con HRP, la reazione è stata rivelata tramite chemiluminescenza (ECL, Amersham). Per il rilevamento della PrP^{Sc} gli omogenati sono stati digeriti con proteinasi K (20µg/ml) per 1 h a 37°C e poi trattati con il sample buffer sopra descritto. I materiali biologici e gli strumenti venivano decontaminati secondo le procedure in uso per gli agenti patogeni non convenzionali (Taylor, 1996).

RISULTATI

La necropsia non evidenziava alterazioni di rilievo a parte le scadenti condizioni di nutrizione di entrambi gli animali e, limitatamente al becco, edema polmonare ed aree marginali di broncopolmonite. Gli esami batteriologici hanno dato esito negativo per batteri patogeni e per micoplasmi. All'esame istologico dell'encefalo, in entrambe le capre, si osservava, sebbene con diverso grado di estensione e gravità, microvacuolizzazione del neuropilo particolarmente evidente in corrispondenza della commessura anteriore, dei nuclei caudato, pallido e putamen. Nel talamo, mesencefalo, ponte e midollo allungato la spongiosità del neuropilo era ancora più accentuata. I nuclei talamici, sub talamici, pontini e del midollo allungato apparivano spopolati ed i neuroni residui erano in parte vacuolizzati. Nel mesencefalo l'entità delle vacuolizzazioni neuronali, con neuroni aumentati di volume per la presenza di ampi vacuoli multipli che conferivano al loro citoplasma un aspetto schiumoso a grosse bolle, era particolarmente evidente. All'esame immunostochimico i due sieri utilizzati, anche se con diverso grado d'intensità, riconoscevano la PrP^{Sc} che appariva, in parte sparsa nelle aree spongiotiche, in parte concentrata nel citoplasma degli astrociti compresi i loro prolungamenti e si presentava sotto forma di placchette a contorni sfumati, isolate o confluenti. Non si notavano addensamenti di PrP^{Sc} attorno ai vasi e parimenti negativi erano i neuroni sia vacuolizzati che di aspetto normale. Nel cervelletto i depositi di PrP^{Sc} erano nello strato molecolare, più addensati in prossimità dello strato dei granuli e, localmente anche all'interno

di quest'ultimo. L'esame istologico della tonsilla palatina rivelava una lieve tonsillite catarrale. La colorazione immunoistochimica marcava positivamente il citoplasma di elementi linfo-istiocitari nei centri germinativi di numerosi follicoli linfatici. L'Western blotting, eseguito in parallelo con un campione di pecora positivo per Scrapie e con i relativi controlli negativi, risultava positivo come indicato da : 1) il permanere di una reattività del campione anche dopo trattamento con proteinasi K; 2) la diminuzione del peso molecolare della parte principale della PrP da 33-30 Kd a 27-30 Kd; 3) la presenza del classico pattern di distribuzione della PrP^{sc} con tre bande ben distinte corrispondenti alle forme diglicosilata, monoglicosilata e non glicosilata.

La diagnosi di Scrapie formulata sulla base dei risultati illustrati è stata ulteriormente confermata dal Centro di referenza per lo studio delle encefalopatie animali e neuropatologie comparate.

DISCUSSIONE

Le capre sono sensibili alla Scrapie e quando conviventi con pecore malate possono contrarre la malattia (Harcourt et al, 1974; Hourrigan et al. 1969; Andrews et al 1992). Tuttavia, nel nostro caso, l'indagine epidemiologica sia attuale che retrospettiva, non ha evidenziato la presenza di sintomi neurologici nelle pecore conviventi. Inoltre, benchè tutti gli animali fossero stati vaccinati circa 4 anni prima, con un vaccino inattivato contro l'agalassia contagiosa contenente mammelle ed encefali di pecore affette da *Mycoplasma agalactiae*, solo le capre adulte avevano manifestato grave deperimento organico ed aumento della mortalità (30 animali erano deceduti nel biennio 1996-97). Una mortalità così elevata, concentrata in un periodo così breve, in una sola delle specie allevate difficilmente sembra imputabile ad un'infezione naturale di Scrapie che, come è ben noto, è caratterizzata da bassa incidenza (Liberski, 1993). Pertanto l'ipotesi di una trasmissione jatrogena della Scrapie sembra più probabile rispetto ad un'infezione orizzontale da pecora a capra. L'assenza di sintomi clinici nelle pecore potrebbe infatti essere giustificata dalla naturale resistenza che alcuni ovini dimostrano verso alcuni ceppi di Scrapie (Prusiner, 1988; Liberski, 1993). Attualmente tutti gli animali presenti in allevamento appaiono asintomatici e, considerata l'anamnesi del gruppo ed in particolare, il picco di mortalità registrato nel biennio 1996-97, è presumibile che i casi di Scrapie qui segnalati siano relativi ad un focolaio ormai in fase di spontanea regressione. Se non fosse stato per il becco rinvenuto morto fuori dall'allevamento e per le indagini inerenti il focolaio sarebbe potuto restare inosservato. I risultati ottenuti concorrono alla raccolta dei dati epidemiologici sulla diffusione della Scrapie nel patrimonio ovi-caprino nazionale e rafforzano l'ipotesi jatrogena dei recenti episodi di Scrapie segnalati nelle capre. Infatti, sia nei focolai segnalati negli ultimi anni nel centro sud dell'Italia, sia nel focolaio da noi descritto, gli animali erano stati inoculati con vaccini contro l'agalassia contagiosa prodotti dallo stesso laboratorio (Capucchio et al, 1998; Agrimi et al,

1999). La sicura differenziazione tra Scrapie naturale e jatrogena permetterebbe di ridimensionare l'allarme connesso all'elevata morbilità della Scrapie negli allevamenti italiani.

BIBLIOGRAFIA

1. Agrimi U, Ru G, Cardone F, Pocchiari M, Caramelli M: Epidemic of trasmissible spongiform encephalopathy in sheep and goats in Italy. *Lancet* **353**: 560-561, 1999
2. Andrews AH; Laven R; Matthews JG: Clinical observation on four cases of scrapie in goats. *Vet Rec* **130**:101, 1992.
3. Andrews AH: Natural occurrence of scrapie in goats in Italy. *Vet Rec* **31**:512,1998.
4. Brotherstone JG; Renwick CC; Stamp JJ; Zlotnik I; Pattison IH: Spread of scrapie by contact to goats and sheep. *J comp Pathol* **78**:9-17, 1968.
5. Chelle PL: Un cas de tremblante chez la chèvre. *Bull Acad Vet Fr* **15**:294-295, 1942.
6. Capucchio MT; Guarda F; Isaia MC; Caracappa S; Di Marco V: Natural occurrence of scrapie in goats in Italy. *Vet Rec* **143**: 452-453, 1998.
7. Carter GR: Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycolgy edited by Charles C Thomas Publisher, Springfield Illinois-USA, 1994
8. Gelmetti D; Gibelli L; De Simone F; Barbieri.I; Vecchi G; Cammarata G; Tagliavini F: Monitoraggio di encefalopatie da virus lenti e Scrapie negli ovini- Ricerche finalizzate del Ministero della Sanità N° 26-1995, 1998.
9. Guarda F, Valenza F, Cantini Cortellezzi G: Epidemiologia e diffusione della Scrapie in Italia. *Nuovo Prog Vet XLVI (2)*: 56-58, 1991
10. Hadlow WJ: The pathology of experimental scrapie in the dairy goat. *res Vet Sci* **2**: 289-314, 1961.
11. Hadlow WJ; Kennedy RC; Race RE, Eklund CM: Virologic and neurohistologic findings in dairy goats affected with natural Scrapie. *Vet. Pathol* : **17** 187-199, 1980.
12. Harcourt RA, Anderson MA: Naturally-occurring scrapie in goats *Vet Rec* **1**:504, 1974.
13. Hourrigan JL; Klingsporn AL, McDaniel HA; Riemenschneider MN: Natural scrapie in goat. *J Am Vet Med Assoc* **154**:538-539, 1969.
14. Liberski PP: The enigma of slow viruses fact and artefact. *Archiv Virology* **6**: 50-61, 1993.
15. Perrin GG; Perrin GJ; Benoit C: Detection of scrapie-associated fibrils in scrapie in goats. *vet Rec* **129**:432, 1991.
16. Prusiner SB: Molecular structure, biology and genetics of prions. *Adv Virus Res* **35**: 83-136, 1988.
17. Taylor DM: The resistance of the bovine spongiform encephalopathy agent to inactivation. *B.C.V.A. Edimburgh* 443-446, 1996
18. Zlotnik I: The histopathology of the brain of goats affected with scrapie. *J Comp Pathol* **71**: 440-448, 1961.
19. Wood JLN, Done SH: Natural scrapie in goats: neuropathology. *Vet Rec* **131**:93-96, 1992.
- Wood, JLN; Done SH; Pritchard GC; Wooldridge MJA: Natural scrapie in goats: case history and clinical signs. *Vet Rec* **131**:66-68, 1992.

INFEZIONE DA DERMATOPHILUS CONGOLENSIS NEL CAMOSCIO.

SEGNALAZIONE DI DUE CASI

Sironi G.¹, Grilli G.¹, Citterio C.², Sala M.², Vallone L.³, Finazzi M.¹

1) Istituto di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviaria;

2) Istituto di Patologia generale veterinaria;

3) Istituto di Ispezione degli Alimenti di origine animale. Università degli Studi di Milano

INTRODUZIONE

Dermatophilus congolensis è un actinomicete responsabile di infezioni cutanee che colpiscono l'uomo e svariate specie di animali domestici e selvatici. L'infezione si manifesta inizialmente sotto forma di dermatite crostosa superficiale con spiccata tendenza ad evolvere estendendosi in profondità e complicandosi a seguito di irruzione secondaria di altri agenti batterici o fungini. La malattia è stata descritta in tutti i continenti compresa l'Europa, ma con particolare diffusione nelle aree a clima tropicale e sub-tropicale (Jones *et al.*, 1997). In Italia la sua presenza è stata per la prima volta descritta, in Sardegna, da Leoni *et al.* (1993) in una pecora. Con questa nota si vuole segnalare la presenza della malattia anche in metapopolazioni di camosci selvatici delle zone alpine lombarde.

MATERIALI E METODI

Nell'arco di un mese (novembre-dicembre), durante la stagione venatoria '98, sono state recapitate all'Istituto di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviaria le carcasse eviscerate di due camosci adulti, un maschio di cinque anni ed una femmina di sei, abbattuti rispettivamente in Val Belviso (SO) e sulle Alpi lecchesi. Entrambi i soggetti erano in scadenti condizioni di nutrizione. Le lesioni erano evidenti prima dell'abbattimento solo nel maschio. La femmina presentava un notevole ritardo di muta. In entrambi i casi, dopo attento esame macroscopico del rivestimento cutaneo, sono stati prelevati campioni di cute per esami istologici e batteriologici.

Le sezioni istologiche di cute, preventivamente fissata in formalina ed inclusa in paraffina, sono state colorate con Ematossilina-Eosina, PAS, colorazione di Gram. Campioni di cute sono stati seminati in piastre di Tryptone Soya Agar al 5% di sangue di montone (Hi Media), incubate a 37° C per 24 h in aerobiosi e in microaerofilia utilizzando una miscela al 10% di CO₂ e 5-7% di O₂ prodotta dal sistema Anaerocult C (Merck, Darmstadt). Nel primo caso gli stessi campioni sono inoltre stati seminati su Agar Sabouraud e le colonie ivi cresciute sono quindi state trapiantate su Mycobiotic (Difco).

RISULTATI

Nel primo caso il soggetto presentava ad una prima osservazione ampie aree alopeciche nelle regioni degli arti. Ad una più attenta osservazione si potevano notare in tali aree erosioni più o meno estese dello strato epidermico mentre nelle restanti parti del mantello il pelo, conglutinato in formazioni crostose, era facilmente asportabile. Nel secondo caso invece le lesioni erano sempre alopeciche e crostose ma focali e limitate a piccole zone della testa (dorso del naso e rime palpebrali) e della parte distale degli arti in prossimità degli unghiali.

Le lesioni istologiche erano dominate, nel primo caso, da reperti di epidermite essudativa con lieve acantosi, marcata iperparacheratosi e presenza di colonie batteriche ed ife fungine superficiali e nello spessore dello strato corneo. In alcune aree si rinvenivano erosioni ed ulcerazioni profonde ricoperte da spesse e dense formazioni crostose nelle quali si rilevavano strutture diafane allungate ed intersecantisi tra loro, circondate da un alone debolmente basofilo. Gli strati superficiali dermici erano interessati da una flogosi di tipo prevalentemente linfo-plasmacellulare. Con la PAS-reazione, in alcune sezioni risultavano ben evidenti ife fungine settate sia sulla superficie epidermica che nel derma superficiale. Le strutture allungate osservate al centro delle lesioni crostose erano negative. Con la colorazione di Gram, invece, tali strutture risultavano decisamente positive e costituite da catene di batteri disposti parallelamente in modo ordinato a costituire filamenti multisettati. Il caratteristico aspetto morfologico e la Gram positività ci hanno permesso di formulare la diagnosi di infezione da *Dermatophilus congolensis*. Erano comunque presenti nell'ambito della stessa lesione anche altri batteri, isolati od in aggregati, a diversa morfologia ed interpretati quali agenti di irruzione secondaria così come le ife fungine più sopra ricordate. Nel secondo caso invece, le formazioni crostose erano decisamente molto superficiali e coinvolgenti quasi esclusivamente lo strato epiteliale corneo mentre quello spinoso presentava più marcati aspetti di acantosi. In questo secondo caso, ancora, era più evidente una dermatite, sempre superficiale ma a carattere decisamente purulento e a decorso acuto-subacuto. Con la colorazione Ematossilina Eosina e PAS non erano visibili ife fungine nè filamenti multisettati simili a quelli più sopra descritti. Tali formazioni batteriche strutturate si potevano invece osservare in gran numero con la colorazione di Gram tra il detrito necrotico superficiale ed ancor più al di sotto di questo. Anche in questo secondo caso quindi, la diagnosi formulata è stata quella di dermatofilososi.

In tutte le piastre seminate si è avuta un'abbondante crescita di colonie emolitiche e non. Solo nel primo caso, dopo almeno tre passaggi in microaerofilia si sono isolate delle colonie grigiastre emolitiche con superficie rugosa e irregolare. L'esame microscopico di tali colonie ha messo in evidenza batteri Gram positivi, non acido resistenti, disposti parallelamente a formare catene di varia lunghezza, con ramificazioni laterali a 90° alle cui estremità erano talvolta presenti zoospore.

Il comportamento biochimico (catalasi +, ureasi +, gelatinasi + ecc.) era sovrapponibile a quello descritto in letteratura (Nicolet *et al.*, 1967; Holt *et al.*, 1994) per *Dermatophilus congolensis*. Sempre nel primo caso, esito positivo ha dato anche l'esame micologico che ha portato all'isolamento di *Microsporum canis*.

DISCUSSIONE

Dalle osservazioni sopra riportate scaturiscono alcune considerazioni che possono essere brevemente riassunte nei seguenti punti.

- 1) La malattia è da tempo conosciuta e descritta e, dal punto di vista anatomopatologico, i reperti microscopici, quando confermati da idonee colorazioni, non presentano particolari difficoltà diagnostiche, stante la singolarità morfologica degli aggregati batterici.
- 2) Morfologicamente i due reperti qui descritti sono molto diversi per gravità, estensione anatomica, decorso e, trattandosi di lesioni cutanee esposte ad agenti patogeni di irruzione secondaria, largamente diffusi nell'ambiente esterno, potrebbero averne subito l'influenza e rappresentare i due estremi con cui la malattia può manifestarsi. Da un lato in forma diffusa e particolarmente grave, dall'altro sotto forma di lesioni focali multiple di minor gravità e, probabilmente, allo stadio iniziale.
- 3) La malattia è presente sulle nostre Alpi nei camosci in modo simile a quanto rilevato nei paesi alpini con noi confinanti. Analoghi casi episodici sono stati infatti descritti in Svizzera nel camoscio (Nicolet *et al.*, 1967) e nel capriolo (Degiorgis *et al.*, 1997), ed in Austria nel camoscio (Deutz e Hinterdorfer, 1997).
- 4) La segnalazione in diversi distretti dell'arco alpino potrebbe far pensare ad una larga diffusione sul territorio ma la rarità dei casi finora segnalati ci impone prudenza. Peraltro va segnalato come indagini sierologiche nelle Alpi francesi abbiano evidenziato una prevalenza di oltre il 20% sia nel camoscio che nello stambecco (Gauthier *et al.*, 1991). Considerazioni di ordine epidemiologico quali la diffusione dell'infezione e della malattia in relazione all'eventuale interazione tra domestici e selvatici (soprattutto pecora) e all'influenza di fattori climatici (Deutz e Hinterdorfer, 1997; Degiorgis *et al.*, 1997) richiedono necessariamente la raccolta di ulteriori dati.

BIBLIOGRAFIA

1. Degiorgis MP, Suter M, von Tscharnher C, Nicolet J, Giacometti M, Bacciarini LN: Dermatophilosis in a free-ranging roe deer (*Capreolus capreolus*) in Switzerland: case report. Proceedings of the Annual Conference of the American Association of Zoo Veterinarians, October 26-30, Houston/Texas, U.S.A. Pp. 322-323, 1997.
2. Deutz A, Hinterdorfer F: Dermatophilose bei Rind, Pferd und Gemse, Epidemiologie, Diagnostik. Therapie und zoonotische Aspekte. Wien Tierärztl. Mschr. 84, 97-101, 1997
3. Gauthier D, Gibert P, Hars J: Sanitary consequences of mountain cattle breeding on wild ungulates. Atti "International Symposium Ongulés/Ungulates", Tolosa, 2-7 settembre 1991, ed. S.F.E.P.M. - I.R.G.M., Parigi, Tolosa, 621-630.

4. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. IXth ed. Williams & Wilkins, Baltimore, 1994
5. Jones TC, Hunt RD, King NW: *Veterinary Pathology*. VIth ed. Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 486-488, 1997
6. Leoni A, Fadda M, Nieddu AM, Pittau M, Sanna E, Pirino S, Contini A.: Dermatophilosis in sheep: first report in Italy, experimental reproduction and evaluation of immune response. *Bull. Soc. It. Biol. Sper.* 69, 775-783, 1993
7. Nicolet J, Klingher K, Fey H: *Dermatophilus congolensis*, agent de la streptotricose du chamois. *Path. Microbiol.* 30, 831-837, 1967.

UN CASO DI LEUCEMIA ACUTA IN UN CAVALLO

Roccabianca P., Castagnaro M., Giuliani A.

Istituto di Patologia e Igiene Veterinaria, Università degli Studi di Padova

INTRODUZIONE

Le patologie linfoproliferative e mieloproliferative sono relativamente poco frequenti nella specie equina.^{11,13} Le segnalazioni di leucemie primarie nel cavallo sono assai rare,^{3,5,7,13,15,16} e solo due casi di linfoma secondariamente leucemico sono stati descritti in letteratura.^{1,12} Nel cavallo, le leucemie croniche sono più frequentemente di tipo linfocitico^{1,7,12} mentre le forme acute sembrano originare dalla linea mieloide.^{3,13,15,16} Solo due leucemie linfocitiche, una di origine B ed una T, sono state fino ad oggi caratterizzate dal punto di vista fenotipico.⁷ Al contrario, la dimostrazione di un'origine mieloide si è sempre basata solo su dati citomorfologici ed esami citochimici^{5,13} senza l'associazione di studi fenotipici.

MATERIALI E METODI

Una cavalla di razza olandese di 22 anni è stata sottoposta ad esame necroscopico. Campioni di milza, fegato, intestino tenue, colon e cieco, linfonodi meseraici e toracici, reni, vescica, ovaie, diaframma, polmone, cuore, sistema nervoso centrale, midollo spinale e cute sono stati fissati in formalina tamponata, inclusi in paraffina, tagliati in sezioni dello spessore di cinque micron e colorati con Ematossilina ed Eosina. Sezioni di fegato e polmone, preparate su vetrini polilisinati, sono state utilizzate per le colorazioni immunoistochimiche. Gli anticorpi utilizzati riconoscevano il fattore VIII (Dako, Glostrup, Danimarca), la porzione intracitoplasmatica della catena ϵ del CD3 (Clone A452, Dako, Glostrup, Danimarca), e la catena intracitoplasmatica del recettore dei linfociti B (CD79a) (Clone Hm57, Dako). Le sezioni di tessuto utilizzate per il riconoscimento delle molecole CD3 e CD79a, una volta sparaffinate e reidratate, sono state incubate nel forno a microonde con una soluzione di tampone citrato (0,01 M, pH 6.0) ai fini di un adeguato smascheramento antigenico. Nessuna procedura addizionale era necessaria per l'identificazione del fattore VIII. All'incubazione con gli anticorpi primari seguivano lavaggi e l'applicazione di anticorpi secondari biotinilati anti-topo (CD79a) e anti-coniglio (fattore VIII e CD3) seguendo il metodo ABC descritto precedentemente.⁶

RISULTATI

La cavalla presentava sintomi clinici di abbattimento, anoressia, dimagrimento, edemi sottocutanei della regione ventrale dell'addome e degli arti, pallore delle mucose, ittero, tachipnea, tachicardia e

tachisfigmia. Il profilo ematologico rivelava una lieve anemia ipocromica (eritrociti: $4,1 \cdot 10^6 \times \text{mm}^3$, emoglobina: 8.1 g/dl) ed una grave piastrinopenia ($<1000/\text{mm}^3$). La conta differenziale dei leucociti era nella norma. Il profilo biochimico era caratterizzato da grave alterazione della funzionalità epatica (bilirubina totale 4.96 mg/dl, creatinichinasi $>1500 \text{ U/l}$, γ -GT 64.4 U/l, trigliceridi 509 mg/dl, Colesterolo 177 mg/dl). La somministrazione di antiinfiammatori steroidei era seguita da un improvviso miglioramento dell'animale con successiva assunzione di cibo. Poche ore dopo la cavalla mostrava grave difficoltà respiratoria, movimenti incontrollati associati ad autotraumatismi e morte spontanea il terzo giorno dalla visita clinica.

L'esame autoptico rivelava mucose pallide ed itteriche. All'apertura della cavità addominale, si osservava la presenza di un ematoma di forma bilobata e dimensioni di 130 cm per 85 cm che dissecava la porzione tendinea del diaframma e si estendeva in posizione retroperitoneale, lungo il legamento longitudinale ventrale, fino alla regione ombelicale. L'ematoma era composto da abbondante quantità di sangue scuro, scarsamente coagulabile e da numerosi coaguli a diversi stadi di organizzazione. Intestino tenue, colon e cieco presentavano grave edema della parete. Erano inoltre presenti spleno- ed epatomegalia di notevole entità. Nessun linfonodo superficiale o delle cavità addominale e toracica si presentava aumentato di volume. All'apertura del torace, i polmoni mostravano congestione diffusa ed ipostasi a carico del polmone destro.

All'esame istologico cellule rotonde atipiche infiltravano il parenchima splenico ed erano contenute nei sinusoidi epatici fortemente dilatati. Le stesse cellule atipiche obliteravano il lume vascolare della maggior parte degli organi esaminati ed erano particolarmente evidenti nei vasi dei setti polmonari e nei glomeruli renali. La porzione muscolare del diaframma presentava emorragie interstiziali associate alla presenza di numerosissimi macrofagi in attiva eritrofagocitosi o contenenti pigmento di origine emoglobinica a diversi stadi di degradazione. Erano evidenti segni di degenerazione e atrofia delle fibre muscolari e sostituzione della muscolatura da parte di materiale ematico coagulato in diversi stadi di organizzazione. Ad eccezione di un imponente edema di parete intestinale e sottocute, nessun ulteriore reperto di rilievo era evidenziabile a carico degli organi parenchimatosi presi in esame. Le cellule neoplastiche mostravano marcata anisocariosi ed anisocitosi e spiccato pleomorfismo. Queste cellule erano assai voluminose (30-50 micron), occasionalmente binucleate, con grossi nuclei ovali, indentati o pleomorfi. I nuclei avevano un disegno cromatinico finemente addensato o erano vescicolosi e contenevano da uno a quattro evidenti nucleoli. Le cellule neoplastiche possedevano citoplasma debolmente eosinofilo in quantità variabile e, occasionalmente, mostravano attività eritrofagocitaria. Sulla base della presentazione clinica, citologica e dei dati anatomopatologici era posto il sospetto di una leucemia di origine mieloide o megacarioblastica. Le cellule neoplastiche non esprimevano il fattore VIII, escludendo

un'origine megacarioblastica, erano CD3 negative, escludendo l'origine da linfociti T. Tuttavia, le cellule neoplastiche esprimevano il CD79a. Sulla base dei dati immunistochemici era posta la diagnosi di una leucemia acuta a grosse cellule di origine B.

DISCUSSIONE

In questo caso, la sintomatologia clinica, la rapida progressione, la presenza di cellule atipiche negli spazi vascolari e l'espressione della molecola CD79a permettevano la diagnosi di una leucemia acuta di origine B.

Le leucemie croniche segnalate nella specie equina erano caratterizzate da una morfologia linfocitica e da un fenotipo B o T.⁷ Nell'uomo, le leucemie croniche derivano, nella maggior parte dei casi, da linfociti B² mentre nel cane e nel gatto l'origine è primariamente T (Moore et al., in via di pubblicazione). Indipendentemente dal fenotipo, le leucemie croniche sono, in genere, caratterizzate da una lenta progressione e da una buona risposta alla chemioterapia.^{4,14} Le leucemie acute descritte nel cavallo hanno prevalentemente una derivazione mieloide o mielomonocitica.^{3,5,13,15,16} Queste segnalazioni suggeriscono una differenza tra specie equina ed umana dove sono frequenti leucemie con un'origine B.⁸ Sfortunatamente, soprattutto in medicina veterinaria, la diagnosi delle leucemie mieloidi si è sempre basata sull'identificazione delle caratteristiche morfologiche cellulari e sull'applicazione di tecniche citochimiche.^{5,10,13} Con l'avvento della citofotometria a flusso, l'utilizzo delle indagini citochimiche è stato sempre più relegato ad un piano secondario dovuto alla scarsa specificità di queste tecniche.⁹

La presentazione clinica ed i reperti citomorfologici di questo caso erano simili ad alcuni casi di leucemia mieloide descritti precedentemente in letteratura.^{3,5,15} Queste similitudini ed i reperti di eritrofangocitosi suggerivano anche in questo caso un'origine mieloide. Tuttavia, l'esame immunistochemico rivelava un'intensa espressione della molecola CD79a che rappresenta una delle porzioni del recettore di membrana presente specificamente nei linfociti B.

Recentemente, 31 casi di linfoma sono stati tipizzati nella specie equina.¹¹ La maggior parte dei linfomi B avevano localizzazione splenica o sottocutanea, erano di tipo diffuso ed erano prevalentemente composti da cellule con una morfologia sovrapponibile a quella evidenziata in questo caso. Tuttavia, nessun caso di linfoma B era associato ad una presentazione leucemica.¹¹ Solo un caso di linfoma con evoluzione leucemica è stato caratterizzato nel cavallo.¹² Tuttavia, in questo caso, le cellule atipiche nel sangue avevano una morfologia riferibile a linfociti maturi che non esprimevano immunoglobuline di superficie e perciò erano interpretate come cellule di origine T¹²

Queste osservazioni mettono in evidenza nette differenze citomorfologiche tra linfomi e leucemie di tipo B del cavallo e di altre specie. Le peculiarità morfologiche dei linfomi e delle leucemie equine di tipo B suggeriscono di affrontare con cautela una diagnosi fenotipica sulla sola base dei dati morfologici ed istochimici.

Questo caso rappresenta la prima segnalazione di una leucemia acuta di tipo B nel cavallo. La somiglianza di questo caso con forme di leucemia mieloide acuta descritte nel cavallo suggerisce inoltre la necessità di una precisa classificazione di queste neoplasie, approccio che richiede una sistematica integrazione dei criteri citomorfologici con dati di immunofenotipo.

BIBLIOGRAFIA

1. Allen B, Wannop CC, Wright IM: Multicentric lymphosarcoma with lymphoblastic leukemia in a young horse. *Vet Rec* **115**: 130-131, 1984
2. Bennett JM, Catovsky D, Daniel M-T: Proposals for the classification of chronic (mature) B and T lymphoid malignancies. *J Clin Pathol* **42**: 567-584, 1989
3. Blue J, Perdrizet J, Brown E: Pulmonary aspergillosis in a horse with myelomonocytic leukemia. *J Am Vet Med Assoc* **190**: 1562-1564, 1987
4. Brouet JC, Seligmann M: Chronic Lymphocytic Leukaemia as an immunoproliferative disorder. *Clin Haematol* **6**: 169-180, 1977
5. Burkhardt E, v. Saldern F, Huskamp B: Monocytic leukemia in a horse. *Vet Pathol* **21**: 394-398, 1984
6. Caniatti M, Roccabianca P, Scanziani E, Paltrinieri S, Moore PF: Canine lymphoma: immunocytochemical analysis of fine-needle aspiration biopsy. *Vet Pathol* **33**: 204-212, 1996
7. Dascanio JJ, Zhang CH, Antczak DF, Blue JT, Simmons TR: Differentiation of chronic lymphocytic leukemia in the horse. A report of two cases. *J Vet Intern Med* **6**: 225-229, 1992
8. De Rossi G, Grossi C, Tabilio A, Vegna L, Lo Coco F, Annino L, Camera A, Cascavilla N, Ciolli S, Del Poeta G, Liso V, Mandelli F: Immunophenotype of acute lymphoblastic leukemia cells: the experience of the Italian cooperative group. *Leukemia and Lymphoma* **9**: 221-228, 1992
9. Geisler CH, Larsen JK, Hansen NE: Prognostic importance of flow cytometric immunophenotyping of 540 consecutive patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **78**: 1795-1802, 1991
10. Goasguen JE, Bennett JM: Classification of myeloid leukemia. *Clin Lab Med* **10**: 661-631, 1990
11. Kelley LC, Mahaffey EA: Equine malignant lymphomas: morphologic and immunohistochemical classification. *Vet Pathol* **35**: 241-252, 1998
12. Madewell BR, Carlson GP, J MN, Feldman BF: Lymphosarcoma with leukemia in a horse. *Am J Vet Res* **43**: 807-812, 1982
13. Mori T, Ishida T, Washizu T, Yamagami T, Umeda M, Sugiyama M, Motoyoshi S: Acute myelomonocytic leukemia in a horse. *Vet Pathol* **28**: 344-346, 1991
14. Moulton JE, Harvey JW: Tumors of the lymphoid and hematopoietic tissues. *In: Tumors in Domestic Animals*, ed. Moulton J, pp. 231-296. University of California Press, Berkeley, CA, 1990
15. Ringger NC, Edens L, Bain P, Raskin RE, Larock R: Acute myelogenous leukemia in a mare. *Aust Vet J* **75**: 329-331, 1997
16. Spier SJ, Madewell BR, Zinkl JG, Ryan AM: Acute myelomonocytic leukemia in a horse. *J Am Vet Med Assoc* **188**: 861-863, 1986
17. Vernau W, Valli V, Dukes TW, Jacobs RM, Shoukri M, Heeney J: Classification of 1,198 cases of bovine lymphoma using the National Cancer Institute working formulation for human non-Hodgkin's lymphomas. *Vet Pathol* **29**: 183-195, 1992

DIAGNOSTICA INTRAVITALE E POSTMORTALE DELLA PERITONITE INFETTIVA FELINA

Saverio Paltrinieri

Istituto di Patologia Generale Veterinaria – Milano

INTRODUZIONE

La Peritonite Infettiva Felina (FIP) colpisce i felini domestici e selvatici ed è sostenuta da Coronavirus (Feline Coronavirus o FCoV). Il virus responsabile (FIPV) è una variante mutata del FECV (Feline Enteric Coronavirus)¹ identico morfologicamente e antigenicamente, ma meno patogeno: le enteriti da FECV sono inapparenti o lievi,² l'infezione da FIPV è sistemica e letale,¹ soprattutto in gatti giovani o con più di 10 anni.^{3,4} Non sussiste predisposizione di sesso o di razza:^{5,6} la maggior incidenza in gatti di razza pura⁶ è dovuta all'affollamento negli allevamenti⁵ e la maggiore incidenza nei mesi freddi all'affollamento in locali chiusi.^{1,6} Gravidanza, interventi chirurgici, infezioni intercorrenti favoriscono la comparsa della FIP.^{1,7}

Alla diagnosi certa si arriva solo con l'istologia.¹¹ Clinicamente la forma essudativa o umida, è caratterizzata da versamenti intracavitari,¹ mentre quella non essudativa o secca da sintomi legati a lesioni granulomatose in diversi organi, inclusi occhio e sistema nervoso centrale.^{8,9} Da un punto di vista ematologico si riscontrano alterazioni aspecifiche (leucocitosi neutrofila, linfopenia, anemia non rigenerativa) mentre sono considerate specifiche iperproteidemia con iperglobulinemia a carico delle frazioni α_2 e γ .^{1,10} L'indagine sierologica non offre risultati probanti,¹ per l'impossibilità di distinguere antigenicamente il FECV e il FIPV o addirittura altri coronavirus^{1,11,12} con conseguenti false positività, mentre falsi negativi possono dipendere dalla formazione di immunocomplessi.¹ Neppure metodi sofisticati quali la nested RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) distinguono il genoma dei due FCoV.¹²

L'esame del versamento, se presente, può essere invece altamente probante: accanto a particolari caratteristiche macroscopiche e citologiche,¹ si rileva un elevato contenuto proteico, con alte percentuali di γ -globuline.^{1,13,14} Il riscontro del FIPV mediante immunofluorescenza può confermare la diagnosi.¹⁴

Alla luce dei problemi sopraesposti, ci si può avvicinare alla diagnosi certa valutando nell'insieme, dati anamnestici, clinici e di laboratorio. A tale scopo è stato elaborato uno schema diagnostico che attribuisce un diverso peso alle alterazioni sopraelencate.¹

Allo scopo di verificare la potenzialità diagnostica dei differenti test effettuabili "in vivo", e, nel contempo, di trarre informazioni epidemiologiche sulla diffusione della malattia sono stati

analizzati campioni provenienti da gatti con sintomi riferibili a FIP, correlando poi i risultati ottenuti con le successive diagnosi anatomico-istopatologiche.

MATERIALE E METODI

Oggetto della presente indagine sono stati 82 gatti con sintomi riferibili a FIP. Come valori di riferimento sono stati utilizzati quelli ottenuti da 14 gatti clinicamente sani, di età, razza, sesso variabili e correlabili a quelli dei soggetti patologici. Da ogni gatto 3 ml di sangue sono stati prelevati dalla vena cefalica dell'avambraccio e posti in parte in provette contenenti EDTA, e in parte in provette prive di anticoagulante.

Mediante analizzatore automatico (Seac Hemat 8) è stato effettuato un esame emocromocitometrico completo con valutazione della formula leucocitaria su striscio colorato con metodo di May Grunwald-Giemsa e della percentuale reticolocitaria dopo colorazione con blu brillante di cresile. In capillari da microematocrito, è stato valutato l'Icterus Index.¹⁵ Le proteine totali nel siero sono state misurate con un autoanalizzatore discreto (Abbott VP), usando il metodo colorimetrico al biureto (Abbott). L'elettroforesi delle proteine è stata eseguita col metodo semimicro, su strisce di poliacetato di cellulosa, poi lette in densitometro (Gelman DCD16). I titoli anticorpali sono stati valutati mediante un kit ELISA del commercio (Dyaset) e le relative piastre sono state lette a 450 nm in analizzatore automatico (Dasit Multiskan). Sul versamento sono stati effettuati un esame citologico dopo citocentrifugazione e colorazione con May Grünwald-Giemsa, il dosaggio delle proteine, l'elettroforesi e la valutazione del titolo anticorpale anti-FCoV, come descritto in precedenza. Inoltre è stata eseguita la ricerca del FCoV mediante immunofluorescenza diretta.¹⁴ I dati raccolti sono stati utilizzati per la diagnosi "in vivo" di FIP secondo Pedersen.¹

La diagnosi finale è stata ottenuta da campioni biotipici e necroscopici, posti in formalina tamponata isoosmotica al 10%, inclusi in paraffina, sezionati al microtomo, e colorati con Ematossilina-Eosina e mediante immunoistochimica, utilizzando, come siero primario, un anticorpo monoclonale di topo anti-FIPV (E₁E₁G₁₁), donatoci dal Prof. N.C. Pedersen (Università di Davis, U.S.A.). Il legame antigene-anticorpo è stato evidenziato con un kit commerciale (Vectastain Elite) mediante la reazione di immunoperossidasi denominata "complesso avidina-biotina-perossidasi" (ABC)¹⁶.

Per i diversi dati ottenuti, sono stati calcolati i seguenti parametri:¹⁷ sensibilità, specificità, valore predittivo positivo (PPV) e negativo (NPV). I valori relativi ai parametri ematologici ed elettroforetici rilevati nei gatti con FIP, in quelli con altre patologie e nei soggetti di controllo, sono stati confrontati tra loro mediante test ANOVA, o mediante il corrispettivo test non parametrico di Kruskal-Wallis.

RISULTATI

61 animali presentavano versamenti addominali, toracici o bicavitari. Nei restanti 21 gatti non erano presenti versamenti. In 38 casi degli 82 esaminati è stato possibile giungere istologicamente alla diagnosi di FIP, in 32 casi essudativa ed in 6 casi secca. Negli altri 44 casi (29 caratterizzati da versamenti) le diagnosi sono state le seguenti: Tumori, 19 casi (10 carcinomi, 1 linfoma, 2 emangiosarcomi, 1 mesotelioma, 1 plasmocitoma); Degenerazioni epato-renali, 9 casi; Insufficienze cardiache, 6 casi; Malattie infettive, 8 casi (4 Parvovirosi, 1 TBC, 1 Morbo di Aujeszky, 2 Nocardiosi); Parassitosi intestinale, 1 caso; Rottura epatica, 1 caso.

Da un punto di vista epidemiologico, nonostante il campione osservato fosse riferibile solo ad una parte, seppur ampia, dei casi di FIP effettivamente rilevabili nell'area di osservazione, è stato possibile confermare una maggiore incidenza nei mesi freddi, nei concentramenti di gatti e negli animali giovani, senza predisposizione di razza e sesso.

Da un punto di vista ematologico i gatti con FIP hanno mostrato alterazioni non specifiche (modica anemia normocitica normocromica non rigenerativa, aumento del grado di ittero, leucocitosi neutrofila con spostamento a sinistra, eosinopenia e linfopenia), più evidenti nelle forme essudative. Fatta eccezione per eosinopenia e linfopenia nessun parametro ematologico raggiunge valori di predittività tali da diagnosticare o escludere la FIP. In entrambi i gruppi patologici è stato rilevato un aumento delle proteine totali e in particolare delle globuline. Tali aumenti sono risultati molto più marcati in corso di FIP, con aumento di α_2 - e γ -globuline (le prime soprattutto nelle forme umide, le seconde nelle secche) ed abbassamento del rapporto albumine/globuline. Solo elevati livelli delle diverse classi di globuline, comunque, raggiungono alti livelli di specificità, mentre il valore predittivo delle alterazioni del protidogramma non è particolarmente elevato. L'analisi dei titoli anticorpali ha permesso di rilevare, sia nei controlli che nei due gruppi patologici, diversi livelli di positività, senza poter determinare un valore soglia utile a fini diagnostici.

La maggior parte (87,5%) dei versamenti prelevati in corso di FIP ma anche alcuni (27,6%) dei versamenti prelevati da gatti con altre patologie, erano compatibili morfologicamente con la diagnosi di FIP. L'analisi citologica è risultata compatibile nel 75% dei casi di FIP e solo raramente (6,8%) negli altri versamenti, nei quali, spesso (34,5%) si sono evidenziati elementi patognomonici della patologia in atto (cellule neoplastiche, batteri, ecc...). Nei gatti con FIP si sono osservati un contenuto proteico più elevato ed alte concentrazioni di α_2 e γ globuline. Anche nel versamento sono rilevabili livelli variabili di anticorpi indipendentemente dalla presenza di FIP. Anche se le caratteristiche morfologiche, citologiche e proteiche del versamento sono dotate di sensibilità e valori predittivi relativamente elevati, la ricerca del FCoV con immunofluorescenza diretta risulta

l'unico test dotato anche di alta specificità, nonostante un falso positivo, peraltro caratterizzato da aspetti clinico-patologici tali da non escludere una forma iperacuta di FIP.

Lo schema diagnostico suggerito da Pedersen¹ che valuta globalmente aspetti clinico-patologici ed anamnestici, fornisce alti valori predittivi solo nelle forme essudative.

L'esame anatomo-patologico ha consentito di identificare lesioni patognomiche e di giungere con relativa sicurezza alla diagnosi di FIP in 37 dei 38 casi esaminati. L'unico caso che ha richiesto l'esame istopatologico per confermare la diagnosi era relativo ad una forma non effusiva caratterizzata esclusivamente da noduli confluenti renali di aspetto tale da non poter escludere altre forme granulomatose (es. TBC o leucosi). Per quanto riguarda i gatti colpiti da altre patologie, senza entrare nel dettaglio delle lesioni riscontrate, va sottolineato che in 9 casi (20,4%) le caratteristiche dell'essudato e la presenza di lesioni focali non consentivano di escludere a priori, senza esame istologico, la FIP. L'istologia ha invece permesso di risolvere i dubbi diagnostici in tutti i casi di FIP, raggiungendo valori di sensibilità e di VPN del 100% e di specificità e VPP superiori al 97%, mentre l'analisi immunocitochimica pur mostrando elevata specificità (100%) e un alto VPP (100%) ha consentito di evidenziare il virus della FIP solo nell'84% dei casi.

DISCUSSIONE

I dati raccolti nel presente lavoro hanno permesso di confermare i dati epidemiologici segnalati in letteratura.^{1,3,4,5,6,7} e di sottolineare l'importanza di affrontare globalmente i vari dati anamnestico-laboratoristici per giungere ad una diagnosi conclusiva di FIP¹: sotto questo punto di vista i reperti di laboratorio che danno migliori garanzie di diagnosi, in termini di sensibilità e specificità sono rappresentati dal riscontro di eosinopenia, linfopenia, iperglobulinemia in particolare della serie α_2 e γ . Tali parametri sono anche quelli caratterizzati dai migliori valori predittivi positivi e negativi. L'analisi del versamento resta uno dei test più attendibili nelle forme effusive, a patto di considerare globalmente l'aspetto citologico, il contenuto proteico ed eventualmente ricercando il virus mediante immunofluorescenza diretta, che, nonostante la presenza di un caso, peraltro dubbio, di falsa positività, fornisce risultati diagnostici molto affidabili. Nonostante l'ampia gamma di test utilizzati, il mezzo diagnostico più efficace rimane l'esame anatomo-istopatologico mentre la ricerca del virus mediante immunocitochimica può essere considerata utile più a fini di studio della patogenesi che non per la diagnosi, anche alla luce della notevole variabilità di distribuzione del virus tra diverse lesioni dello stesso soggetto.¹⁶

BIBLIOGRAFIA

1. Pedersen NC: An overview of feline enteric coronavirus and infectious peritonitis virus infections. *Feline Practice* 23: 7-20, 1995.

2. Pedersen NC, Boyle JF, Floyd K., Fudge A, Barker J: An enteric coronavirus infection of cats and its relationship to feline infectious peritonitis. *Am J Vet Rec* 42: 368-377, 1981.
3. Horzinek MC, Osterheus ADME: Feline infectious peritonitis: a worldwide serosurvey. *Am J Vet Res.* 40:1487-92, 1979
4. Pedersen NC: *Feline Husbandry*, American Veterinary Publications (Mosby), Goleta, CA, 1991, pp 393-446.
5. Kass P, Dent T.: The epidemiology of FIP in catteries. *Fel Pract* 23: 27-32, 1995.
6. Foley JE, Poland A, Carlson J, Pedersen NC: Risk factors for feline infectious peritonitis among cats in multiple cat environments with endemic feline enteric coronavirus. *JAVMA.* 210:1313-1318, 1997.
7. Poland AM, Vennema H Foley JE, Pedersen NC: Two related strains of feline infectious peritonitis virus isolated from immunocompromised cats infected with a feline enteric coronavirus. *J Clin Micro* 34:3180-3184, 1996
8. Doherty MJ: Ocular manifestation of feline infectious peritonitis. *J.A.V.M.A.* 159: 417-424, 1971.
9. Kline KL, Joseph RJ, Averill DR: Feline infectious peritonitis with neurologic involvement: clinical and pathological findings in 24 cats. *J.A.A.H.A.* 30: 111-118, 1994
10. Sparkes AH, Gruffydd-Jones TJ, Harbour DA: An appraisal of the value of laboratory tests in the diagnosis of feline infectious peritonitis. *JAAHA* 30:345-350, 1994.
11. Barlough JE, Stoddart CA: Feline Infectious Peritonitis. *Vet Rep.* 1, 13-17, 1990
12. Herrewegh A, Egberink HF, Horzinek MC, Rottier PJM, Groot RJ: Polymerase chain reaction (PCR) for diagnosis of naturally occurring feline coronavirus infections. *Feline Practice* 23: 56-60, 1995.
13. Shelley SM, Scarlett-Kranz J, Blue JT: Protein electrophoresis on effusion from cats as a diagnostic test for feline infectious peritonitis. *JAAHA* 24:495-498, 1987.
14. Paltrinieri S., Cammarata Parodi M., Cammarata G.: In vivo diagnosis of feline infectious peritonitis by comparison of protein content, cytology and direct immunofluorescence test on peritoneal and pleural effusions. *J. Vet. Diagn. Invest.* In press 1999
15. Jain NC: *Essentials of Veterinary Hematology.*, Lea & Febiger, Philadelphia 1993.
16. Tammer R, Evensen O, Lutz H, Reinacher M: Immunohistological demonstration of feline infectious peritonitis virus antigen in paraffin-embedded tissues using feline ascites or murine monoclonal antibodies. *Vet Immunol Immunopathol.* 49:177-182, 1995.
17. Gerstman BB, Capucci DT: Evaluating the reliability of diagnostic test results. *JAVMA* 188:248-251, 1986

ENCEFALO-RETINOPATIA VIRALE (VNN) IN STADI GIOVANILI DI BRANZINO
(*D. Labrax*) IN ASSENZA DI LESIONI TIPICHE DI VACUOLIZZAZIONE CELLULARE
Galeotti M.¹, Beraldo P.¹, Patarnello P.³, Sarli G.², Volpatti D.¹.

¹Sezione di Biologia e Patologia Animale - Dipartimento di Scienze della Produzione Animale - Facoltà di Medicina Veterinaria- Università di Udine.

²Sezione di Patologia Generale e Anatomia Patologica Veterinaria - Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale - Facoltà di Medicina Veterinaria- Università di Bologna.

³Veterinario L.P. Specialista in Acquacoltura e Ittiopatologia.

INTRODUZIONE

L'encefalo-retinopatia virale o "viral nervous necrosis" (VNN) è una malattia virale segnalata per la prima volta in branzini allevati nell'Isola di Martinica da Bellance e Gallet di St.-Aurin nel 1988. La malattia fino dall'inizio venne associata a sintomatologia nervosa e a presenza di lesioni a carico del sistema nervoso centrale. Dalla prima segnalazione ne sono avvenute numerose altre in differenti specie ittiche marine allevate, interessando prevalentemente gli stadi larvali e giovanili: nel barramundi, *Lates calcarifer* (Glazebrook *et al.*, 1990; Reanault *et al.*, 1991), ancora nel branzino, *Dicentrarchus labrax* (Breuil *et al.*, 1991), nel rombo, *Scotophilus maximus* (Bloch e Gravningen *et al.*, 1991) e nell'*Hypoglossus hypoglossus* (Grotmol *et al.*, 1995). Analogamente è stata segnalata in *Oplegnatus fasciatus* (Yoshikoshi e Inoue, 1990), *Epinephelus akaara* (Mori *et al.*, 1991), *Pseudocarex dentex* (Mori *et al.*, 1992), *Paralichthys olivaceus* (Nguyen *et al.*, 1994), *Epinephelus moara* (Nakai *et al.*, 1994). L'agente è stato classificato come appartenente alla famiglia dei Nodaviridae. Indagini con l'impiego della PCR hanno stabilito l'esistenza di una sequenza conservata nel "coat-protein" dei nodavirus dei pesci, con una stretta correlazione tra loro (92%), ma una divergenza rispetto ai nodavirus degli insetti (Nishizawa *et al.*, 1995). Le prime segnalazioni della malattia erano a carico di stadi larvali e di avannotti, mentre successivamente è stata descritta anche in adulti all'ingrasso (Le Breton *et al.*, 1997) e, in forma asintomatica, nei riproduttori di striped jack (Nishizawa *et al.*, 1994). Nel branzino la malattia è condizionata dalla temperatura in quanto a basse temperature (13°C) non si manifesta, oppure i sintomi sono molto lievi, mentre a temperature più alte (25-26°C) si osservano gli episodi più gravi, accompagnati da forti mortalità.

La sintomatologia appare in genere al 10° giorno dalla schiusa, con un massimo tra 25 e 40 giorni, con una mortalità che può raggiungere il 100% dell'effettivo, in caso di larve, mentre è più ridotta in caso di giovanili (Sweetman *et al.*, 1996). Nei giovanili di 0.5 - 5 g la sintomatologia è di tipo nervoso, con nuoto anormale e scoordinato, accompagnato da incurvamento del dorso. Nei soggetti di taglia compresa fra 10 a 600 g si possono avere sia la forma acuta che subacuta, con perdita

dell'appetito e alterazioni del nuoto, fino a sintomi nervosi con nuoto rotatorio, ipereccitabilità, movimenti di entrata ed uscita dall'acqua, talvolta cecità (Sweetman *et al.*, 1996).

A livello istologico, in tali specie, la malattia provoca una intensa vacuolizzazione citoplasmatica dei neuroni del S.N.C., mentre nell'occhio i vacuoli sono localizzati esclusivamente negli strati nucleari della retina (Grotmol *et al.*, 1997; Bovo *et al.*, 1996; Jung-Sungju *et al.*, 1996; Nguyen Hd *et al.*, 1996; Le Breton *et al.*, 1997).

L'esame istopatologico (IS) ha costituito fino dall'inizio il metodo più valido per individuare larve o giovanili affetti dalla malattia, in quanto il netto quadro di spongiosi a carico del cervello, midollo spinale e occhio ha permesso di emettere diagnosi di nodaviriosi. A questo esame si è unita con successo l'immunofluorescenza (IF) e l'immunoistochimica (IIC) mediante anticorpi policlonali o monoclonali per il virus della nodaviriosi del branzino, abbinato alla individuazione del virus (dimensioni medie 28 - 30 nm) mediante microscopia elettronica. Le tipiche lesioni istologiche della malattia sono state sempre descritte negli stadi larvali e nei giovanili delle varie specie colpite da nodavirus, mentre nei soggetti sopra l'anno di età (Bovo *et al.*, 1996) il quadro istologico non risulta sempre chiaro, e sono molto scarse o mancano del tutto le tipiche vacuolizzazioni delle cellule nervose.

Al momento in letteratura sono scarse le segnalazioni di casi di nodaviriosi con assenza delle tipiche lesioni istologiche in specie di pesci sensibili alla malattia sotto l'anno di età.

Il presente lavoro descrive per la prima volta il rinvenimento di numerosi soggetti giovanili di branzino, di età compresa fra i 60 e i 280 giorni, colpiti da nodaviriosi sintomatica e asintomatica, nei quali mancano del tutto le tipiche lesioni di vacuolizzazione delle cellule nervose del S.N.C. e dell'occhio, ma che risultano in vario modo positivi con la tecnica IIC. Questo risultato abbassa notevolmente l'età sotto la quale la nodaviriosi del branzino può essere presente in soggetti con sintomatologia clinica, senza presentare evidenti lesioni istologiche.

MATERIALI E METODI

I giovanili di branzino di età compresa fra i 60 e i 280 giorni provenivano tutti da allevamenti presenti in varie aree del Mediterraneo occidentale, alto Ionio (Grecia). I soggetti sono stati prelevati in 10 campionamenti, effettuati in quattro differenti siti (A,B,C e D) in un arco di tempo che andava da settembre 1998 a marzo 1999. I pesci presentavano una sintomatologia clinica molto varia, come illustrato nelle tabelle 1 e 2, che riportano soltanto una parte dei dati. Alcuni non presentavano alcuna sintomatologia evidente, ma nelle vasche di allevamento era presente una mortalità da lieve a discreta; altri presentavano un grave stato di denutrizione con retrazione

addominale, oppure deformazioni scheletriche, mentre altri ancora presentavano esoftalmo, rigonfiamento occipitale e timpanismo addominale. In alcuni gruppi era evidente una tipica sintomatologia nervosa. Un campione proveniva da un gruppo di soggetti che apparentemente sani, senza alcuna sintomatologia.

I campioni sono stati fissati immediatamente dopo il prelievo in formalina tamponata al 10%. La permanenza in formalina non ha superato i 7 giorni. Successivamente sono stati inclusi in paraffina per ottenere delle sezioni seriate di 5 μ utilizzate per le colorazioni istologiche e per l'IIC. Il metodo di rivelazione utilizzato per l'IIC è stato quello dell'avidina-biotina-complex (ABC)-perossidasi (DAKO). Le sezioni sono state incubate con un anticorpo policlonale anti-virus della VNN del branzino, gentilmente fornito dal Dr. Baudin-Laurencin, (CNEVA, Brest). I controlli utilizzati sono stati i seguenti: anticorpo policlonale per il virus della IPN dei pesci, utilizzato alla stessa diluizione di lavoro dell'anticorpo per la VNN, su sezioni sicuramente positive per VNN; controllo di cervello di branzino adulto sicuramente positivo; controllo di cervello di branzino adulto sicuramente negativo; omissione dell'anticorpo primario.

RISULTATI

I risultati delle indagini istologiche e immunoistochimiche che riguardano i pesci provenienti dai siti A e B, che a nostro avviso risultano più rappresentativi, sono sinteticamente riportati nelle tabelle 1 e 2. In breve dei 5 campionamenti effettuati nel sito A (acqua di pozzo, 18°C, età 60-75 giorni), 3 manifestavano sintomi nervosi con esame IS + e IIC +, mentre 2 non presentavano sintomi nervosi, con esame IS (-) e IIC +. Nel sito B (acqua di mare, 15-16°C, età 120-198 giorni) entrambi i campioni non presentavano sintomatologia nervosa, con esame IS (-), ma uno risultava IIC (-) mentre l'altro IIC +. Nel sito C (acqua di mare, 14-15°C, età 140-240 giorni), 1 campione non esibiva sintomatologia nervosa, presenta esame IS (-) e IIC +, mentre l'altro campione esibiva sintomatologia nervosa, con esame IS + e IIC +. Nel sito D (acqua di mare, 26-27°C, età 240-280 giorni), l'unico campione presentava sintomatologia nervosa con esame IS (-) e IIC +. Nel complesso dei 10 campioni esaminati, 5 presentavano sintomatologia nervosa, accompagnata da lesioni istologiche (eccetto un campione) e tutti presentano esame IIC +. 5 campioni non esibivano sintomatologia nervosa, presentano istologia negativa, e in 4 su 5 presentano esame IIC +. Nei soggetti che presentano lesioni istologiche classiche di VNN, il quadro è dominato da una forte vacuolizzazione dei vari strati della retina e da una intensa vacuolizzazione del cervello, midollo allungato e spinale (neuroni e neuroglia). La positività IIC è sempre molto pronunciata. Nei campioni di pesci che presentano, invece, un quadro istologico meno conclamato, si osservano

vacuoli nel citoplasma di alcune cellule degli strati retinici, soprattutto nello strato nucleare interno, mentre nel SNC si evidenziano rari vacuoli nel citoplasma dei neuroni del midollo allungato e in quello spinale. Il quadro è spesso accompagnato da iperacidofilia del citoplasma di alcuni neuroni, mentre altri mostrano segni di rarefazione. La positività IIC è presente in un numero discreto di neuroni dei tessuti appena descritti. In altri soggetti il numero di cellule vacuolizzate nella retina e nel SNC appare molto ridotto, come pure le cellule positive all'esame IIC, effettuato su sezioni seriate. Spesso le cellule che risultano positive all'IIC non sono quelle che presentano la tipica vacuolizzazione del citoplasma. Nell'ultimo quadro istologico osservato nella presente indagine, non si evidenziano assolutamente lesioni riferibili alla VNN, né altre lesioni di tipo degenerativo e infiammatorio. All'esame IIC si osservano invece rare cellule positive nel SNC, ma soprattutto a carico della retina. Nei campioni con queste caratteristiche, il 14% dei pesci esaminati presentava il quadro appena descritto.

TABELLA 1 . Postlarve di branzino con assenza di lesione classiche di VNN.

| Provenienza | Sintomi clinici e les. macroscopiche | Istologia | Immunoistochimica |
|--|--|---|--|
| Gen.'99 Sito A Acqua di pozzo 18°C 60 giorni | sintomi nervosi esoftalmo; rigonfiamento occipitale; timpanismo vescicale | Occhio: vacuoli nel citoplasma di alcune cellule degli strati retinici. SNC: rari vacuoli nel citoplasma dei neuroni del midollo allungato e spinale. Iperacidofilia dei pirenofori. Rarefazione del citoplasma di alcuni neuroni. | Occhio: cellule positive localizzate negli strati plessiforme interno, esterno e in quello nucleare. SNC: positiviti i pirenofori di vari neuroni localizzati nel midollo allungato. |
| Mar.'99 Sito A Acqua di pozzo 18°C 68 giorni | deformazioni scheletriche; grave stato di denutrizione | Assenza di evidenti lesioni a carico del SNC, fatta eccezione per rarissime vacuolizzazioni di pochi neuroni. Rarefazione del citoplasma delle cellule degli strati retinici. | Occhio: rare cellule positive localizzate negli strati plessiforme interno, esterno e in quello nucleare. Il 14% dei soggetti risulta positivo. |
| Feb.'99 Sito A Acqua di pozzo 18°C 75 giorni | grave stato di denutrizione con retrazione addominale | Assenza di evidenti lesioni a carico del SNC. In alcuni soggetti la mucosa intestinale appare appiattita con aspetti degenerativi. | Occhio: positive rare cellule dello strato nucleare interno; SNC: positiviti i pirenofori di alcuni neuroni localizzati nel midollo allungato; Il 14% dei soggetti risulta positivo. |

TABELLA 2. Giovanili di branzino con differenti quadri di VNN a temperature dell'acqua di 14-15°C.

| Provenienza | Sintomi clinici e les. macroscopiche | Istologia | Immunohistochimica |
|--|---|--|-----------------------------------|
| Feb. 99 Sito C Acqua di mare 14.15°C 220-240 gior. | lieve mortalità ; rari sintomi nervosi | 1° quadro (16) Occhio: vacuolizzazione di varie cellule dello strato nucleare interno. SNC: vacuolizzazione di numerose cellule del diencefalo, mesencefalo, cervelletto, midollo allungato; inclusi cit. e fenomeni carioretici nelle cellule della neuroglia; congestione vasale | Occhio: positivo SNC: positivo |
| | " | 2° quadro (4) Occhio: vacuolizzazione di alcune cellule dello strato nucleare interno. SNC: assenza del tipico aspetto spongioso dei neuroni, rari fenomeni iniziali di vacuolizzazione. | Occhio: positivo SNC: positivo |
| | " | 3° quadro (4) SNC: forte congestione dei vasi nel cervello; assenza vacuoli cit. | SNC: positivo |

DISCUSSIONE

La encefalo-retinopatia virale del branzino è una malattia che provoca gravi mortalità negli stadi larvali e giovanili di questa specie. Negli stadi larvali la sintomatologia clinica è evidente, mentre nei giovanili la malattia può presentarsi in modo acuto o subacuto, con una riduzione sensibile della mortalità e una diminuzione della sintomatologia clinica. La sintomatologia nervosa può anche non comparire, pur riscontrando una continua mortalità da lieve a pronunciata.

Le lesioni istologiche a carico del S.N.C. e dell'occhio hanno sempre caratterizzato i focolai di malattia degli stadi larvali e giovanili del branzino (Breuil *et al.*, 1991, Bovo *et al.*, 1996) come quelli di altre specie sensibili alla nodavirus (Glazebrook *et al.*, 1990; Mori *et al.*, 1991; Nguyen *et al.*, 1996; Grotmol *et al.*, 1997). Le lesioni più caratteristiche sono costituite da vacuolizzazione lieve o molto pronunciata del citoplasma dei neuroni del S.N.C e dello strato nucleare profondo della retina. Nel S.N.C. un forte interessamento si osserva a carico del midollo spinale, soprattutto nella porzione soprastante alla vescica natatoria. L'esame istologico è stato utilizzato spesso al fine di attuare ampi monitoraggi per valutare la diffusione della malattia nelle avannotterie (Sweetman *et al.*, 1996).

La malattia subisce una forte attenuazione della sintomatologia e delle lesioni istologiche passando a soggetti di circa un anno. In questi ultimi infatti non è sempre facile osservare i tipici fenomeni di vacuolizzazione delle cellule nervose, che vengono talvolta sostituiti da forte congestione del

tessuto e da blandi fenomeni degenerativi a carico dei neuroni del S.N.C. (Bovo et al., 1996). In questi soggetti il solo esame istologico non sembra garantire efficacia al fine di individuare in modo rapido e corretto focolai di malattia. Questa situazione non è mai stata segnalata in soggetti allo stadio di postlarve e in giovanili, nei quali l'indagine istologica ha sempre garantito, almeno in via preliminare, un valido sistema di individuazione di soggetti ammalati, per poi procedere con indagini più approfondite (IF, IIC, ME, PCR).

I risultati di questa indagine, condotta in allevamenti di varie aree del Mediterraneo occidentale, alto Ionio (Grecia), sembrano indicare che è possibile individuare episodi di malattia, con sintomatologia scarsa o poco definita, nei quali si rinvenivano giovanili di branzino che all'età di 60 giorni (postlarve) non presentano istologicamente le classiche lesioni imputabili a nodaviriosi, ma risultano positive all'esame IIC. Lo stesso dato si può osservare anche in taglie più grandi (120-240 giorni) in differenti condizioni di allevamento, con acque a 14-15°C, dove si rinvenivano focolai di malattia con assenza di tipica sintomatologia nervosa, ma positività IIC in 3 campioni su 4. Le basse temperature condizionano sicuramente la forma acuta di malattia, che rimane però ad uno stato latente con una sintomatologia subdola. Interessante appare anche il risultato del campione del sito D (età 240-280 giorni) con acque a 26-27°C, ottimali per il manifestarsi della malattia, nel quale accanto ad una scarsa sintomatologia nervosa, non si rinvenivano lesioni istologiche tipiche, ma una costante positività IIC.

Questa ricerca ha permesso di evidenziare alcuni aspetti importanti sulla nodaviriosi del branzino: 1) anche in soggetti allo stadio di postlarve, o comunque giovanili (60-75 giorni), la VNN può manifestarsi con assenza di tipiche lesioni di vacuolizzazione delle cellule nervose; 2) la VNN può provocare focolai di malattia, anche se con sintomatologia scarsa o inapparente, a temperature basse come 14-15°C, indicando che anche nel branzino si assiste ad un adattamento del virus a temperature più basse rispetto a quelle classiche; 3) nei casi con scarsissime cellule positive all'esame IIC, è opportuno prestare molta attenzione alla retina, che appare un sito di frequente reperimento dell'antigene virale; 4) l'esame IIC rappresenta un metodo estremamente sensibile per l'individuazione di pesci affetti da VNN con assenza di lesioni classiche e in presenza di quantità bassissime di virus.

BIBLIOGRAFIA

1. BELLANCE R., GALLET de SAINT-AURIN D. (1988) - L'encéphalite virale du loup de mer. Caraïbes Medical, **Avril, Mai, Juin**; 105-114.
2. BREUIL G., BONAMI J.R., PEPIN J.F., PICHOT Y. (1991) - Viral infection (picorna-like virus) associated with mass mortalities in hatchery-reared sea-bass *Dicentrarchus labrax* larvae and juveniles. *Aquaculture*, **97**; 109-116.
3. BLOCH B., GRAVNINGEN K., LARSEN J.L. (1991) - Encephalo-myelitis among turbot associated with a picornavirus-like agent. *Dis. Aquat. Org.*, **10**; 65-70.

4. BOVO G., BORGHESAN F., MUTINELLI F., MONTESI F., COMUZZI M. (1996) - Encefalo-retinopatia virale del branzino d'allevamento: prima segnalazione nel territorio nazionale. *Boll. Soc. It. Patol. Ittica*, 19; 52-64.
5. GLAZEBROOK J.S., HEASMAN M.P., de BEER S.W. (1990) - Picorna like viral particles associated with mass mortalities in larval barramundi, *Lates calcarifer* bloch. *J. Fish Dis.*, 13, 245-249
6. GROTMOL S., TOTLAND GK., KVELLESTAD A., FJELL K., OLSEN A.B. (1995) - Mass mortality of larval and juvenile hatchery-reared halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) associated with the presence of virus-like particles in vacuolated lesions in the central nervous system and retina. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 15(5); 176-180.
7. GROTMOL S., TOTLAND GK., THOURUD K. (1997) - Vacuolating encephalopathy associated with a nodavirus-like agent: a probable cause of mass mortality of cultured larval and juveniles Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*. *Dis. Aquat. Org.*, 29(2); 85-97.
8. JUNG-SUNGU, MIYAZAKI T., MIYATA M., OISHI T. (1996) - Histopathological studies on viral nervous necrosis in a new host, Japanese sea bass *Lateolabrax japonicus*. *Bull. Fac. Biores.*, 16; 9-16.
9. LE BRETON A., GRISEZ L., SWEETMAN J., OLLEVIER F. (1997). Viral nervous necrosis (VNN) associated with mass mortalities in cage reared sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Journal of Fish Disease*. 20 (2) 145-151.
10. MORI K., NAKAI T., MUROGA K., ARIMOTO M., MUSHIAKE K., FURUSAWA I. (1992) - Properties of a new virus belonging to Nodaviridae found in larval striped jack (*Pseudocarranx dentex*) with nervous necrosis. *Virology*, 187; 368-371.
11. MORI K., NAKAI T., NAGAHARA M., MUROGA K., MEKUCHI T., KANNO T. (1991) - A viral disease in hatchery-reared larvae and juveniles of redspotted grouper. *Gyobyo Kenkyu*, 26; 209-210.
12. NAKAI T., NGUYEN H.D., NISHIZAWA T., MUROGA K., ARIMOTO M., OOTSUKI K. (1994) - Occurrence of viral nervous necrosis in Kelp grouper and tiger puffer. *Fish Pathology*, 29; 211-212.
13. NGUYEN HD., NAKAI T., MUROGA K. (1996) - Progression of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) infection in naturally and experimentally infected striped jack *Pseudocarranx dentex* larvae. *Dis. Aquat. Org.*, 24(2); 99-105.
14. NGUYEN HD., MEKUCHI K., IMURA K., NAKAI T., NISHIZAWA T., MUROGA K. (1994) - Occurrence of viral nervous necrosis (VNN) in hatchery-reared juveniles Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries Science* 60, 551-554.
15. NISHIZAWA T., MORI T., FURUHASHI M., NAKAI T., FURUSAWA I., MUROGA K. (1995) - Comparison of the coat protein genes of five fish nodaviruses, the causative agents of viral nervous necrosis in marine fish. *J. Gen. Vir.*, 76; 1563-1569.
16. NISHIZAWA T., MORI T., NAKAI T., FURUSAWA I., MUROGA K. (1994) Polymerase chain reaction (PCR) amplification of RNA of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Dis. Aquat. Org.*, 18(2); 103-107.
17. RENAULT T., HAFFNER Ph., BAUDIN LAURENCIN F., BREUIL G., BONAMI J.R. (1991) - Mass mortalities in hatchery-reared sea bass (*Lates calcarifer*) larvae associated with the presence in the brain and retina of virus-like particles. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 11; 68-73.
18. SWEETMAN E., SWEETMAN J., Le BRETON A., GRISEZ L. (1996) - Nodavirus: a review of the findings of the XIV/NODA/95 investigation. "Seabass and seabream culture: problems and prospects", 16th-18th october, Verona-Italy; 87-101.
19. YOSHIKOSHI K. e INOUE K. (1990). Viral nervous necrosis in hatchery-reared larvae and juveniles of Japanese parrotfish, *Oplegnathus fasciatus*. *Journal of Fish Diseases* 13, 69-77.

MICROMETASTASI LINFONODALI NEI TUMORI MAMMARI MALIGNI DELLA CAGNA

°Sarli G., °Berton D., °Benazzi C., *Galeotti M., °Marcato P.S.

°Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale - Sezione di Patologia Generale e Anatomia Patologica - Facoltà di Medicina Veterinaria - Università degli Studi di Bologna;

*Dipartimento di Scienze della Produzione Animale - Sezione di Biologia e Patologia Animale - Facoltà di Medicina Veterinaria - Università degli Studi di Udine.

INTRODUZIONE

Il concetto di “metastasi occulta” del linfonodo regionale nei tumori mammari maligni è stato inizialmente presentato da Shapir e Amromin nel 1948. Adottando la tecnica delle sezioni seriate colorate con ematossilina-eosina gli Autori riscontrarono, in una percentuale di donne portatrici di carcinoma della mammella, e graduate come linfonodo-negative, la presenza di cellule carcinomatose nel linfocentro ascellare originariamente considerato negativo. Il termine “metastasi occulta” è oggi sostituito dal termine “micrometastasi” ed è differente da quello, secondo noi improprio, di “macrometastasi”. Infatti Dowlatshai e coll. (1997) considerano micrometastasi quelle difficilmente identificabili con l’esame istologico di routine, e “macrometastasi” quelle facilmente identificabili. In ciò l’incongruenza del prefisso “macro” attribuito al rilievo mediante esame istologico. Nella presente nota le micrometastasi saranno intese e nominate secondo quanto definito da Dowlatshai e coll. (1997), mentre le “macrometastasi”, intese sempre secondo i sopracitati autori, saranno riferite semplicemente come metastasi.

Dalla prima segnalazione di Shapir e Amromin (1948) altri studi analoghi sono stati effettuati impiegando come metodo di rivelazione sezioni seriate e non, e più recentemente la metodica immunoistochimica verso antigeni epiteliali (pancheratina, cocktail di citocheratine, antigene carcinoembrionario (CEA), antigene epiteliale di membrana (EMA)) o la RT-PCR verso l’mRNA della citocheratina 19, del CEA o verso l’oncogene c-erb B2 (Dowlatshahi et al., 1997). L’impulso per tali indagini nasceva soprattutto dal significato prognostico che esse potevano rivestire. Sembra oggi assodato che la presenza di micrometastasi peggiori sia l’intervallo libero da cancro che la sopravvivenza rispetto ai soggetti linfonodo-negativi (Dowlatshahi et al., 1997).

Nostre recenti indagini (Benazzi e coll., 1999; Galeotti e coll., 1998) sui tumori mammari maligni della cagna, che avevano lo scopo di valutare la sopravvivenza in funzione di diversi parametri, tra cui lo stadio istologico secondo Gilbertson e coll. (1983), hanno messo in evidenza un periodo post-operatorio significativamente più basso nei soggetti a stadio istologico II (presenza di emboli endovasali e/o coinvolgimento del linfonodo), rispetto ai soggetti a stadio istologico 0 (tumore maligno non infiltrante) o a stadio I (tumore maligno infiltrante con invasione stromale).

Nell'ambito di ogni gruppo, ma soprattutto negli stadi I e II, si sente l'esigenza di utilizzare altri parametri di graduazione, per definire meglio il rischio di recidiva o metastasi. Ai fini della sopravvivenza si sono rivelati utili, in tal senso, il grado nucleare (Gilbertson e coll., 1983), la microvascolarizzazione (Bettini e coll., 1997) e la sub-graduazione dello stadio istologico (Galeotti et al., 1998). Scopo della presente nota è la presentazione di risultati preliminari sulla identificazione di micrometastasi linfonodali in cagne con tumore mammario maligno e linfonodo regionale negativo all'esame di routine, e sulla definizione del loro ruolo prognostico nell'arco di 1 e 2 anni post-mastectomia.

MATERIALI E METODI

Sono stati impiegati 101 casi di tumore mammario di cagna fissati in formalina ed inclusi in paraffina, scelti in quanto diagnosticati come maligni e di cui era disponibile il linfonodo regionale (inguinale superficiale o ascellare) come negativo per metastasi secondo l'esame istologico di routine. La diagnosi istologica è stata condotta secondo Marcato (1992) e lo stadio istologico secondo Gilbertson e coll. (1983). Da ogni caso sono state ottenute sezioni di 6 μm , una del tumore mammario e due non seriate del linfonodo regionale, sottoposte a metodica immunohistochimica standard a tre passaggi: inibizione delle perossidasi endogene con metanolo, trattamento con forno a microonde in tampone citrato, siero primario anti-citocheratina 19 (Clone BA17) (Dako) diluito 1:50 e Kit-perossidasi (Società Prodotti Antibiotici). Per ogni sezione è stato previsto un controllo con omissione del siero primario. Dei casi risultati positivi per micrometastasi è stata accertata la sopravvivenza mediante contatto telefonico con i proprietari o con il veterinario referente.

RISULTATI

In tutti i tumori impiegati nell'indagine è stata riscontrata positività per la citocheratina 19. Essa si manifestava con la colorazione marrone del citoplasma delle sole cellule carcinomatose e/o dell'epitelio di lesioni displastiche associate, ma non delle cellule mioepiteliali e/o connettivali presenti nella sezione. Le micrometastasi linfonodali si sono rilevate prevalentemente nel seno sottocapsulare, nello spessore della capsula e più raramente nel tessuto linfoide corticale. Le micrometastasi linfonodali apparivano come singole cellule o aggregati di 4-5, con citoplasma immunocolorato in marrone, come le cellule carcinomatose del tumore primario.

In tabella 1 sono riportate le diagnosi e lo stadio istologico dei 101 casi utilizzati, e il numero e la percentuale, sul totale e per stadio, dei casi positivi per micrometastasi al linfonodo regionale. Come si evince dalla tabella la metodica immunohistochimica applicata ai linfonodi ha fatto rilevare micrometastasi in 23 casi su 101 (22,77%). In particolare: in 1 caso dei 23 (4,3%)

tumori a stadio 0, in 18 casi dei 71 (25,35%) tumori a stadio I e in 4 casi dei 7 (57,14%) a stadio II. Il confronto delle percentuali rilevate, condotto col Metodo Esatto di Fisher, ha fatto registrare una percentuale significativamente più alta nello stadio istologico I comparato a quello 0 ($P=0,03$), più alta ma non statisticamente significativa nello stadio II comparato a quello 0 ($P=0,058$) e nello stadio II confrontato a quello I ($P=0,093$).

In tabella 2 sono specificati, sui 4 linfonodi regionali delle ghiandole mammarie, dati di statistica descrittiva sulla numerosità totale e sulla percentuale di micrometastasi. Il confronto delle percentuali di positività per micrometastasi, condotto con il Metodo Esatto di Fisher, non ha fatto rilevare differenze sia tra la percentuale di positività destra vs sinistra nello stesso gruppo linfonodale ($P=0,26$ linfonodo inguinale superficiale destro vs sinistro; $P=0,52$ linfonodo ascellare destro vs sinistro) sia nel confronto tra percentuale di micrometastasi registrate agli inguinali superficiali, rispetto a quella registrata negli ascellari ($P=0,54$). Poiché con il test impiegato non si è rilevata una differenza statisticamente significativa nella percentuale di positività tra linfonodo inguinale destro e sinistro, il dato 24,41% (percentuale di coinvolgimento del linfonodo inguinale superficiale destro e sinistro) si può considerare indicativo per entrambi i lati. La stessa considerazione non è attualmente applicabile anche al gruppo degli ascellari, stante l'esiguità dei casi totali e soprattutto di quelli positivi per micrometastasi.

Dei 23 soggetti positivi per micrometastasi è stata accertata la sopravvivenza ad 1 anno per 18 soggetti (di 2 non è stato possibile reperire dati e 3 non hanno ancora finito il periodo di osservazione dei 12 mesi), e a 2 anni per 6 soggetti (2 sono morti per metastasi polmonari da tumore mammario rispettivamente a 18 e a 19 mesi, 13 devono ancora completare il periodo di osservazione di 24 mesi, mentre per 2 non è stato possibile reperire dati).

DISCUSSIONE

Dall'esame della casistica utilizzata si evince che in caso di tumore maligno e di linfonodo negativo per metastasi all'esame istologico routinario, la maggior parte dei tumori sono graduabili come a stadio 0 o I. Ciò verosimilmente poiché in casi a stadio II, che per definizione ha emboli nei vasi e/o interessamento del linfonodo regionale (Gilbertson e coll., 1983), l'interessamento linfonodale come metastasi è facilmente individuato. Le percentuali di micrometastasi si sono rivelate progressivamente crescenti progredendo dallo stadio 0 a quello II. Circa quest'ultimo stadio, stante la bassa numerosità di casi ottenuti, il dato è poco commentabile, anche perché la gravità del processo neoplastico è già documentata dalla presenza di emboli endovasali, pur in assenza di dimostrabile interessamento linfonodale. E' noto infatti che in seguito ad inoculazione di cellule neoplastiche nel territorio tributario, il linfonodo regionale funge più da barriera funzionale

che anatomica, e circa il 60% delle cellule inoculate possono semplicemente attraversarlo e guadagnare altre stazioni (Gilson, 1995). Il dato è, a nostro avviso, più interessante circa i tumori a stadio istologico I. Indipendentemente dal fatto di essere più numerosi, forse poiché sono tumori a più grave momento clinico, verso i quali il chirurgo esegue mastectomie radicali ed invia così anche il linfonodo regionale, essi mostrano percentuali di micrometastasi alte, se si considera che, in base ai casi esaminati, 1 tumore su 4 a stadio istologico I può avere micrometastasi. I casi, da noi riesaminati anche dopo il risultato immunohistochimico positivo per micrometastasi, non ci hanno fatto comunque rilevare obiettive indicazioni di invasione vasale nel tumore o alla sua periferia. Il dato che deriva dall'applicazione di metodiche immunohistochimiche anti-citocheratine sul linfonodo regionale, risulta così interessante in quanto permette di stadiare il soggetto con maggiore precisione. Infatti tali soggetti a stadio I, nel momento in cui le micrometastasi vengono rilevate, andrebbero inseriti nel gruppo a stadio II, o comunque separati da quelli a stadio I rimasti linfonodo-negativi.

Sui tumori mammari della cagna esiste già una segnalazione circa l'impiego di anticorpi anti-citocheratine per individuare la presenza di micrometastasi linfonodali (Bush e Rudolph, 1995). In quello studio si rilevò, su 77 casi, una percentuale di positività per micrometastasi pari al 68,8%. La percentuale di positività sul totale (21,8%) da noi ottenuta si avvicina molto ai valori registrati in diversi studi sulla donna (range 9-33%, Dowlathshahi, 1997), mentre è molto diversa da quella ottenuta da Bush e Rudolph. Ciò potrebbe essere imputato alla differente composizione della casistica di partenza in termini di stadio istologico. Infatti maggiore è la frazione di stadi II (che esprimono le più alte percentuali di micrometastasi) più alta può risultare la percentuale media del gruppo.

Il rilevamento di una maggiore rappresentatività dei linfonodi inguinali rispetto agli ascellari trova giustificazione nella maggiore frequenza di neoplasie nelle mammelle inguinali rispetto alle toraciche (Else e Hannant, 1979), ma anche nel fatto che la mastectomia radicale delle mammelle toraciche è più indaginosa rispetto a quella inguinale, ed il chirurgo non asporta il linfonodo ascellare se non palesemente interessato. Sono infatti molti i casi di mammelle toraciche scartati, poiché il linfonodo non era disponibile. In base ai risultati ottenuti sulle micrometastasi in relazione allo stadio, la mancata asportazione del linfonodo ascellare può comportare un rischio crescente, nei tre stadi istologici, di lasciare *in situ* linfonodi con micrometastasi. Considerazione che va vista in funzione del significato prognostico attribuibile alle micrometastasi in medicina veterinaria.

Il significato prognostico delle metastasi al linfonodo regionale in corso di carcinoma della mammella nella cagna è ormai assodato, nel senso di una sopravvivenza significativamente più bassa, rispetto ai soggetti linfonodo-negativi (Parodi, 1983). Invece nello studio di Bush e Rudolph

(1995) il significato della presenza di micrometastasi linfonodali nella cagna in corso di carcinoma della mammella non è stato affrontato in termini di prognosi. Il significato prognostico attribuito alle micrometastasi al linfonodo ascellare nella donna, ha subito nel corso degli anni un profondo cambiamento. Infatti prime indagini che non riuscirono a differenziare la sopravvivenza di soggetti positivi per micrometastasi rispetto a quelli linfonodo-negativi, sono state superate da indagini dell'ultimo decennio che hanno dimostrato non solo una sopravvivenza, ma anche un intervallo libero da cancro, più bassi per lo stesso tipo di confronto. I risultati ottenuti si sono modificati nel tempo per i seguenti motivi: l'introduzione di tecniche nuove per evidenziare le micrometastasi, l'aumento della entità numerica dei casi e l'aumento del tempo di follow up (Dowlatshahi, 1997). Le prime indagini con follow up di 5 anni nella donna sono state oggi rivalutate con tempi non inferiori a 10 anni (Dowlatshahi, 1997). E' rimasta invece invariata nel tempo l'opinione che la presenza di micrometastasi rappresenti una condizione prognosticamente più vantaggiosa della metastasi.

I risultati sul significato prognostico ottenuti con la presente indagine, seppure non conclusivi, si possono prestare alle seguenti considerazioni. La positività per micrometastasi sicuramente non influenza la sopravvivenza ad un anno, così come non risultava influenzata la sopravvivenza nella donna a 5 anni. Tuttavia, sebbene la numerosità per le conclusioni a due anni sia ancora bassa, i 2 casi morti per causa imputabile al tumore mammario prima dello scadere dei due anni, possono essere visti come una indicazione che la presenza di micrometastasi, se pone problemi di sopravvivenza, li influenza tardivamente rispetto alla mastectomia. Anche quest'ultima considerazione si pone in analogia a quanto registrato nella donna, in cui l'influenza sulla sopravvivenza si evince solo con follow up di lunga durata.

BIBLIOGRAFIA

1. Benazzi C., Preziosi R., Sarli G., Galeotti M., Marcato P.S.: Observations on the correlation between histological grading and survival times of canine and feline malignant mammary tumours. *Biomedical Research*, 10, 25-34, 1999.
2. Bettini G., Sarli G., Mandrioli L., Poemi M.G., Marcato P.S.: Prognostic value of intratumoral microvessel density in canine and feline mammary neoplasms. *Atti 15th Meeting ESVP*, 38, 1997.
3. Bush U., Rudolph R.: Mammakarzinom der hündin: eine neue routinediagnostik zum nachweis okkultes mikrometastasen in der regionären lymphknoten. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.*, 108, 43-46, 1995.
4. Dowlatshahi K., Fan M., Snider H.C., Habib F.A.: Lymph node micrometastases from breast carcinoma. Reviewing the dilemma. *Cancer*, 80, 1188-1197, 1997.
5. Galeotti M., Benazzi C., Sarli G., Montagnese M., Marcato P.S.: Parametri istologici di prognosi nei tumori mammari maligni del cane. *Atti 4th European FECAVA-SCIVAC Congress*, 510, 1998
6. Gilbertson S.R., Kurzman D., Zachau R.E., Hurvitz A.I., Black M.M.: Canine mammary epithelial neoplasm: biological implications of morphologic characteristics assessed in 232 dogs. *Veterinary Pathology*, 20, 127-142, 1983.
7. Gilson S.D.: Clinical management of the regional lymph node. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 25, 149-167, 1995.
8. Else R.W., Hannant D.: Some epidemiological aspects of mammary neoplasia in the bitch. *Veterinary Record*, 104, 296-304, 1979.

9. Marcato P.S.: Patologia mammaria animale. Edagricole. Bologna, 1992.
 10. Parodi A.L.: Les éléments du pronostic des cancers mammaires de la chienne. Prat. Méd. Et Chir. Anim. Comp. 18, 31-36, 1983.
 11. Sapir O., Amromin G.D.: Obscure axillary lymph node metastases in carcinoma of the breast. Cancer, 1, 238-241, 1948.

| Tipo istologico | Totale (*) | Stadio 0 (*) | Stadio I (*) | Stadio II (*) |
|-----------------------------------|------------|--------------|--------------|---------------|
| Adenocarcinoma tubulare | 28 (3) | 8 | 16 (2) | 4 (1) |
| Tumore misto maligno | 34 (10) | 10 | 24 (10) | -- |
| Carcinoma papillare | 30 (9) | 5 (1) | 22 (5) | 3 (3) |
| Carcinoma solido§ | 9 (1) | -- | 9 (1) | -- |
| <i>totale</i> | 101 (23) | 23 (1) | 71 (18) | 7 (4) |
| <i>percentuale micrometastasi</i> | 22,77% | 4,35% | 25,35% | 57,14% |

(*) casi positivi per micrometastasi;

§ inclusi 4 casi di carcinoma solido a cellule fusate

Tabella 1. Diagnosi e stadio istologico dei casi utilizzati, numero e percentuale, sul totale e per stadio, dei casi positivi per micrometastasi al linfonodo regionale.

| Linfonodo | Linfonodo | | Micrometastasi | | % Dx + Sx |
|--------------------|-----------|--------------|----------------|-------------|--------------------|
| | N° | % sul totale | N° | % di gruppo | |
| Inguinale destro | 42 | 41,58 | 12 | 28,57 | inguinali 24,41 |
| Inguinale sinistro | 44 | 43,56 | 9 | 20,45 | |
| Ascellare destro | 10 | 9,9 | 2 | 20,00 | ascellari 13,33 |
| Ascellare sinistro | 5 | 4,95 | -- | -- | |

Tabella 2. Dati di statistica descrittiva sui linfonodi regionali utilizzati e su quelli positivi per micrometastasi.

VALUTAZIONE COMPARATIVA DI *MARKERS* IMMUNOISTOCHEMICI PER LA DIAGNOSI DI MESOTELIOMA IN ANIMALI DOMESTICI.

Grieco V.¹, Gelmetti D.², Solimene N.¹, Parodi M.¹.

¹ Istituto di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviare – Facoltà di Veterinaria – Università degli Studi di Milano.

² Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia – Sezione di Milano

INTRODUZIONE

I mesoteliomi negli animali sono relativamente rari. Nella specie canina, ne sono segnalati poco più di 60 casi (Ilgren, 1993) mentre nel bovino, che è più spesso interessato da una forma di mesotelioma congenito, ne sono descritti circa una trentina (Stöber *et al.*, 1990; Wolfe *et al.*, 1991). In altre specie animali la letteratura riporta solo rare e sporadiche segnalazioni (McCullag *et al.*, 1979; Nordstoga e Landsverk, 1981; Lichtensteiger e Leathers, 1987). La rarità di questa neoplasia accresce notevolmente la difficoltà di pervenire ad una diagnosi clinica e di raccogliere una casistica più ampia. Anche la diagnosi anatomopatologica non è sempre facile e spesso si presenta la necessità di discriminare tra mesoteliomi ed altre neoplasie, soprattutto **carcinomi primari e secondari**, che possono interessare le sierose. Secondo gli orientamenti attuali il problema della diagnosi di mesotelioma nei casi dubbi viene affrontato con tecniche istochimiche, ultramicroscopiche ed immunoistochimiche. La principale caratteristica ultrastrutturale delle cellule mesoteliali neoplastiche è rappresentata da sottili e brevi microvilli (Haschimoto *et al.*, 1989). Immunoistochimicamente, mentre le cellule meglio differenziate in senso epiteliale esprimono citocheratine, una parte degli elementi neoplastici meno differenziati può coesprimere vimentina. Non esiste però a tutt'oggi un *marker* assolutamente specifico per il mesotelio, ragione per cui, soprattutto in medicina umana, si suole ricorrere all'impiego di un pannello di anticorpi relativamente ampio, mediante il quale restringere quanto più possibile il residuo dubbio diagnostico (Donna *et al.*, 1986; Montag *et al.*, 1988; Riera *et al.*, 1997). Poiché soltanto pochi *markers* sono stati finora impiegati nell'identificazione di mesoteliomi animali (Hinrichs *et al.*, 1997) abbiamo provato la reattività di alcuni anticorpi di recente produzione su campioni di mesoteliomi provenienti da animali di specie diversa.

MATERIALI E METODI

I mesoteliomi selezionati per i test immunoistochimici sono costituiti da due mesoteliomi del cane (forme papillare e bifasica), due del gatto (forme papillari) e da due mesoteliomi congeniti del bovino. Da ciascun campione, fissato in formalina ed incluso in paraffina, sono state ottenute sezioni di 5 μ di spessore che sono state sottoposte a colorazione con Ematossilina-Eosina e con

tecnica immunistochemica secondo Hsu *et al.*, (1981). Gli anticorpi primari impiegati e le relative diluizioni sono riportati nella tabella seguente (l'anticorpo AMAD-1 è stato gentilmente fornito dal Prof. Donna dell'Ospedale della città di Alessandria)

| Anticorpo | | Provenienza | Diluizione |
|------------------|-------------|--------------------|-------------------|
| CK AE1/AE3 | monoclonale | Boeringer | 1:3000 |
| Vimentina | monoclonale | SIGMA | 1:20000 |
| HBME-1 | monoclonale | DAKO Corp. | 1:400 |
| AMAD-1 | policlonale | Prof. Donna | 1:300 |

Gli anticorpi diretti contro le cellule mesoteliali sono stati anche provati, per confronto, su sezioni ottenute da: due adenocarcinomi (tubulare e cistopapillifero) mammari del cane e due del gatto, due carcinomi bronchiolo-alveolari del cane e due del gatto, un carcinoma bronchiale del cane e uno del gatto, un adenocarcinoma intestinale del cane, un adenocarcinoma prostatico di cane e un polmone normale di bovino.

RISULTATI

Citocheratina AE1/AE3: le cellule mesoteliali normali sono risultate sempre positive per la citocheratina così come quelle neoplastiche ad esclusione delle cellule in mitosi e di quelle multinucleate particolarmente indifferenziate. Tale positività è risultata costante in tutti i mesoteliomi esaminati appartenenti alle tre specie animali considerate (cane, gatto e bovino). In particolare, è da segnalare la positività di un ampio numero di cellule neoplastiche d'aspetto fusato nel mesotelioma bifasico di cane.

Vimentina: le cellule mesoteliali normali sono risultate sempre negative per vimentina. Per ciò che riguarda le cellule neoplastiche, soltanto nel mesotelioma papillare di cane abbiamo notato una estesa positività per vimentina, mentre negli altri casi l'espressione era assai debole e, soprattutto, limitata a poche cellule di isolate aree.

AMAD-1: l'immunoreattività di questo anticorpo è risultata debole ed in parte mascherata da un costante segnale di fondo. Tuttavia, per tutte le specie considerate era evidente un segnale più intenso e significativo nelle cellule mesoteliali normali. Infatti, pur risultando il loro citoplasma solo debolmente positivo, la costante negatività del nucleo rendeva significativa la marcatura. Per ciò che riguarda le cellule neoplastiche, quelle con immunocolorazione meglio rilevabile erano situate sulla superficie delle neoformazioni.

HMBE-1: l'anticorpo ha marcato in maniera assai soddisfacente e senza segnale di fondo le cellule mesoteliali normali e neoplastiche di cane, gatto e bovino. La positività era rappresentata da una sottile linea immunocolorata che circondava a mo' di orletto la parte libera delle cellule

evidenziando quindi in modo particolare, come per l'anticorpo precedente, quelle dello strato superficiale della neoplasia.

I controlli effettuati su altre neoplasie epiteliali hanno escluso che i due anticorpi diretti verso antigeni mesoteliali (AMAD-1 e HBME-1) reagissero verso alcuni epitelii tra quelli più soggetti a neoplasia nelle diverse specie considerate e precisamente verso: l'epitelio mammario normale e neoplastico del cane e del gatto (adenocarcinomi tubulari e cistopapilliferi); verso l'epitelio intestinale normale e neoplastico del cane (adenocarcinoma intestinale); verso l'epitelio normale e neoplastico bronchiolo-alveolare normale e neoplastico del cane e del gatto (adenocarcinoma bronchiolo alveolare); verso l'epitelio prostatico normale, iperplastico e neoplastico del cane. Gli stessi anticorpi non erano, però, in grado di distinguere le cellule mesoteliali dalle cellule bronchiali, sia normali che neoplastiche, del cane e del gatto e dall'epitelio bronchiale normale del bovino.

DISCUSSIONE

Il problema di una diagnosi differenziale tra mesoteliomi e carcinomi degli animali si pone, soprattutto, all'esame istologico di biopsie o campioni tissutali non corredati da rilievi clinico-necroscopici dettagliati. In base ai risultati di questa ricerca, la doppia positività di cellule tumorali verso citocheratine e vimentina indicherebbe con sufficiente precisione la natura mesoteliale del tumore, ma non è risultata costante per la mancata espressione di vimentina da parte delle cellule similepiteliali. Va notato, inoltre, che nei mesoteliomi bifasici sebbene la positività di cellule fusate alle citocheratine sia, qualora presente, molto significativa, è d'altra parte praticamente impossibile distinguere giovani elementi stromali vimentina-positivi, da cellule mesoteliali neoplastiche fusate. L'insufficienza di questi due anticorpi per la precisazione della diagnosi di mesotelioma ha indotto i patologi umani all'impiego un più ampio ventaglio di *markers* (Ordoñez e Mackay, 1996; Fetsch *et al.*, 1997) comprendenti quelli provati nel presente studio (AMAD-1, HBME-1). L'anticorpo policlonale AMAD-1 che, sperimentato da Donna *et al.* (1986), su neoplasie umane ha dimostrato buona specificità per il mesotelioma in assenza di disturbo di fondo, impiegato su mesoteliomi animali ha prodotto risultati mascherati da un costante *background* aspecifico. Tuttavia, pur non costituendo da solo un elemento risolutivo, in pannello con gli altri anticorpi provati, ha contribuito ad avvalorare la diagnosi di mesotelioma. Per ciò che riguarda l'anticorpo monoclonale HBME-1, prodotto verso antigeni umani, l'intensa reattività sulla superficie libera delle cellule mesoteliali ha dimostrato che tale antigene è presente anche in animali di specie diverse. Analogamente a quanto verificato nei casi umani (Riera *et al.*, 1997) questo anticorpo non è stato però in grado di

discriminare tra cellule mesoteliali ed epiteli bronchiali normali o neoplastici. Complessivamente l'uso del pannello di anticorpi selezionati per questa indagine comparativa pur non portando a risultati di valore assoluto consente di migliorare l'approccio diagnostico attraverso un procedimento per esclusione.

Il raggiungimento di una corretta diagnosi di mesotelioma negli animali è di notevole interesse dal punto di vista della patologia comparata. Infatti così come per l'uomo, anche per il cane (Harbison e Godleski, 1983; Glickman *et al.*, 1983) ed il bovino (Croft, 1983; Stöber, 1990) lo sviluppo di mesoteliomi è stato correlato con l'assunzione di fibre di asbesto anfibolico. E' pertanto possibile che, attraverso un controllo veterinario, questi animali possano essere utilizzati come spia di contaminazione ambientale.

BIBLIOGRAFIA

1. Croft W.: Environmental asbestos and mesotheliomas in dairy calves. *Proc. Amer. Ass. Cancer Res.* **24**: 188, 1983.
2. Donna A., Betta P.G., Bellingeri D., Marchesini A.: New marker for mesothelioma: an immunoperoxidase study. *J.Clin. Path.* **39**: 961-968, 1986.
3. Fetsch P.A., Babati A., Hijazi Y.M.: Utility of the antibodies CA 19-9, HBME-1, and thrombomodulin in the diagnosis of malignant mesothelioma and adenocarcinoma in cytology. *Cancer* **84**: 101-108, 1998.
4. Glikman L.T., Domanski L.M., Maguire T.G., Dubielzig R.R., Curg A.: Mesothelioma in pet dogs associated with exposure of their owners to asbestos. *Environ. Res.* **32**: 305-313, 1983.
5. Harbison M.L., Godleski J.J.: Malignant mesothelioma in urban dogs. *Vet.Path.* **20**: 531-540, 1983.
6. Hashimoto N., Oda T., Kadota K.: An ultrastructural study of malignant mesotheliomas in two cows. *Jpn. J. Vet. Sci.* **51**: 327-336, 1989.
7. Hinrichs U., Brugman M., Harps O., Wohlsein P.: Malignant biphasic peritoneal mesothelioma in a horse. *Eur. J. Vet. Path.* **3**: 95-97, 1997.
8. Hsu S.M., Raine L., Fanger H.: Use of the avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.* **29**: 577-580, 1981.
9. Ilgren E.B.: Mesotheliomas of animals: a comprehensive, tabular compendium of the world's literature. CRC Press Boca Raton Ann., London, Tokyo, 1993.
10. Lichtensteiger C.A., Leathers C.W.: Peritoneal mesothelioma in a rabbit. *Vet. Path.* **24**: 464-466, 1987.
11. McCullag K.G., Mews A.R., Pinsent P.J.N.: Diffuse pleural mesothelioma in a goat. *Vet. Path.* **16**: 119-121, 1979.
12. Montag A.G., Pinkus G.S., Corson J.M.: Keratin protein immunoreactivity of sarcomatoid and mixed types of diffuse malignant mesothelioma: an immunoperoxidase study of 30 cases. *Hum. Path.* **19**: 336-342, 1988.
13. Nordstoga K., Landsverk T.: Papillary epicardial mesotheliomas associated with encephalitozoonosis in blue foxes. *Vet. Path.* **18**: 564-566, 1981.
14. Ordonez N.G., MacKay B.: The roles of immunohistochemistry and electron microscopy in distinguishing epithelial mesothelial mesothelioma of the pleura from adenocarcinoma. *Adv. in Anat. Path.* **3**: 273-293, 1996.
15. Riera J.R., Astengo-Osuna C., Longmate J.A., Battifora H.: The immunohistochemical diagnostic panel for epithelial mesothelioma. *The Am. J. Surg. Path.* **21**: 1409-1419, 1997.
16. Stöber M., Tammen F.C., Veltman P., Stockhofe-Zurwieden N., Pohlenz J.: Beitrag zu Mesotheliose des Rindes: Klinische, postmortale und Umwelt-Befunde. *Wien. Tierärztl. Mschr.* **77**: 78-83 e 86-87, 1990.
17. Wolfe D.F., Carson R.L., Hudson R.S., Boosinger T.R., Mysinger P.W., Powe T.A., Klaxton M.S., Angel K.L.: Mesothelioma in cattle eight cases (1970-1988). *J.A.V.M.A.* **199**: 486-491, 1991.

INDAGINI IMMUNOISTOCHEMICHE SULLE PROTEINE DEL CITOSCHELETRO IN MAMMELLE FELINE NORMALI, IPERPLASTICO/DISPLASTICHE E NEOPLASTICHE

Sironi G., Faustino A.M.R., Montemezzo N., Veronesi M.C., Mollo A., Mandelli G.

Istituto di Anatomia patologica veterinaria e Patologia aviare

Istituto di Clinica ostetrica e ginecologica veterinaria - Università degli Studi di Milano.

INTRODUZIONE

Alcuni studi riguardanti l'espressione di proteine del citoscheletro da parte di mammelle normali, iperplastico/displastiche e neoplastiche di gatto sono già stati pubblicati (Moore *et al.* 1989, Ivanyi *et al.* 1992 e 1993, Martín de las Mulas *et al.* 1994 a, b), tuttavia essi si riferiscono a limitate casistiche od appaiono prevalentemente orientati allo studio dei vari tipi di citocheratine. Pertanto abbiamo ritenuto utile sottoporre ad indagini immunohistochemiche mirate una abbastanza ampia raccolta di campioni di tessuto mammario, in parte minore riferibili a ghiandole normali ovvero colpite da alterazioni iperplastico/displastiche, in parte maggiore riferibili a veri tumori. Si rileva preliminarmente che, trattandosi di tumori mammari felini, la quota preponderante di questi è rappresentata da forme epiteliali maligne semplici (adenocarcinomi e carcinomi solidi).

Obiettivo della nostra ricerca è stato quello di studiare, collateralmente ai reperti istologici, quali siano in dettaglio le modificazioni immunohistochemiche cui vanno incontro, nella trasformazione neoplastica, alcune proteine del citoscheletro nei diversi tipi di cellule mammarie coinvolte ed, inoltre, quali potrebbero essere, tra dette modificazioni, quelle più significative ai fini di una possibile valutazione prognostica dei corrispondenti tumori.

MATERIALI E METODI

Il materiale preso in esame in questo studio è costituito da campioni di tessuto mammario felino, sia normale (in numero di 4) e iperplastico/displastico (in numero di 7) che neoplastico (in numero di 40). Detto materiale proveniva da 32 mastectomie e da 3 necroscopie, tutte eseguite su pazienti dell'Istituto di Clinica ostetrica e ginecologica veterinaria dell'Università di Milano. Si trattava di gatte, in prevalenza non castrate, appartenenti alle razze Comune europea (29 soggetti), Siamese (4 soggetti) e Persiana (2 soggetti), di età compresa tra 4 e 19 anni e con media di poco superiore a 12 anni. I campioni neoplastici erano così ripartiti: 2 adenomi semplici, 1 adenoma complesso, 17 adenocarcinomi semplici (di cui 3 metastasi, 2 linfonodali ed 1 polmonare), 15 carcinomi solidi semplici (di cui 1 metastasi linfonodale), 1 carcinoma solido complesso. I campioni istologici sono stati fissati in metacarnoy a 4°C per 18 ore, inclusi in paraffina e tagliati in sezioni seriate di 4 µm. Queste sezioni sono state colorate con Ematossilina-Eosina e ciascuna lesione presente è

stata repertata secondo una versione semplificata della classificazione di Hampe e Misdorp (1974).

Le prove immunostochimiche sono state eseguite mediante la tecnica avidina-biotina-perossidasi utilizzando anticorpi monoclonali di topo contro i seguenti antigeni: Pan-Citocheratina (AE1-AE3; dil. 1:1000), Citocheratina 14 (LL002, dil. 1:2000), α -Actina muscolare liscia (1A4; dil. 1:2000), Vimentina (V9, dil. 1:10000). L'immunomarcatura è stata ottenuta con aminoetilcarbazolo o diaminobenzidina quali cromogeni ed infine le sezioni sono state controcolorate con Ematossilina di Meyer.

I risultati delle prove immunostochimiche sono stati valutati con un criterio semiquantitativo. Per ogni anticorpo impiegato, il quadro di immunoreattività di ogni popolazione cellulare costituente la lesione esaminata ha ricevuto un punteggio variabile da 0 a 4, dove 0 indica la totale negatività delle cellule considerate, 1 indica reperti di positività isolati o sporadici, 2 descrive un quadro di immunoreattività intermedia corrispondente al 50% circa di cellule positive, 3 indica un positività molto diffusa o quasi totale delle cellule considerate, 4 infine descrive una situazione in cui tutti gli elementi della popolazione cellulare esaminata sono immunoreattivi.

RISULTATI

I risultati acquisiti vengono esposti per gruppi di reperti, facendo riferimento alle quattro categorie principali dei campioni esaminati: ghiandole normali (n. 4), ghiandole colpite da iperplasia/dislasi (n. 7), adenomi (n. 3) e carcinomi (adenocarcinomi e carcinomi solidi in n. complessivo di 29 più loro metastasi). Le medie numeriche esprimenti il grado di reattività di ciascun tipo cellulare presente sono riportate nelle figg. 1 - 3.

Ghiandole normali. L'epitelio luminale di dotti ed acini è costituito da cellule quasi tutte positive per PAN-Ck e, in due casi, sporadicamente positive anche per Ck 14. Completa è la negatività per alfa-smAct e per Vimentina.

Il mioepitelio di dette ghiandole è positivo, in maniera debole e solo a livello di dotti, per PAN-Ck, mentre risulta discretamente positivo, ancora nella parete dei dotti, per Ck 14. Più intensa e costante è la sua reattività per Vimentina e soprattutto per α -smAct.

Lo stroma è intensamente e regolarmente positivo solo per Vimentina.

Ghiandole iperplastico/dislastiche. Ad un esame superficiale dei preparati i reperti paiono in gran parte sovrapponibili a quelli delle ghiandole normali, ma ad una analisi più attenta emerge qualche significativa differenza, specialmente a carico del mioepitelio (che evidenzia una più intensa marcatura per PAN-Ck e Ck 14, mentre diminuisce quella per α -smAct e per Vimentina) e dello stroma (che mostra un piccolo numero di cellule fuse positive per α -smAct).

Adenomi. Per quanto concerne l'epitelio neoplastico, l'unico dato saliente è rappresentato dalla comparsa di un certo numero (mediamente intorno al 20%) di cellule positive per Vimentina.

Il mioepitelio dei due adenomi semplici presenta immunomarcatura che, salvo per Vimentina, tende ad

apparire attenuata ed in tale attenuazione sembrano giocare un ruolo essenziale le discontinuità dello strato delle cellule basali. Il mioepitelio proliferante dell'unico adenoma complesso presenta invece elevati indici di positività per tutti gli antisieri impiegati, in particolare per Ck 14, alfa-smAct e Vimentina.

Lo stroma evidenzia un crescente numero di cellule fuse positive per alfa-smAct.

Carcinomi. L'epitelio neoplastico degli adenocarcinomi e dei carcinomi solidi, ferma restando la sua reattività per PAN-Ck, evidenzia nel citoplasma una quantità di Vimentina che è superiore a quella degli adenomi e manifesta anche un variabile ma mediamente elevato grado di positività per Ck 14.

Il mioepitelio basale è quasi ovunque scomparso dall'interfaccia tra epitelio neoplastico e stroma e pertanto assai ridotta in tale sede è la presenza di cellule positive per i quattro antisieri considerati. Fa eccezione l'unico caso di carcinoma solido di tipo complesso, nel quale il mioepitelio proliferante esprime in grado elevato la sua immunomarcatura per PAN-Ck ed ancora più intensamente quelle per Ck 14, alfa-smAct e Vimentina.

Lo stroma peri- ed intratumorale evidenzia un alto numero di cellule fuse positive sia per Vimentina che per alfa-smAct, che dovrebbero pertanto essere considerate dei miofibroblasti.

Le quattro metastasi di tumori diversi prese in esame (3 linfonodali ed 1 polmonare) presentano reazioni immunoistochimiche in larga misura assimilabili a quelle delle neoplasie primarie corrispondenti.

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

Sulla base dei risultati ottenuti, si può affermare che i quattro anticorpi monoclonali da noi utilizzati (PAN-Ck, Ck 14, alfa-smAct e Vimentina) si sono rivelati un valido strumento per lo studio immunoistochimico della mammella felina normale nonché di quella iperplastico/displastica e neoplastica. Essi hanno consentito di dimostrare che nello sviluppo di una vasta gamma di tumori si modifica il quadro istologico ed immunofenotipico di tutti i principali tipi di cellule mammarie, sia epiteliali e mioepiteliali che stromali, e ciò non solo quando direttamente coinvolte nella trasformazione neoplastica, ma anche quando coinvolte del tutto passivamente. Quest'ultima eventualità, da noi già constatata nei tumori mammari del cane (Mandelli *et al.* 1998), si verifica in modo particolarmente palese nei tumori mammari del gatto, che sono quasi sempre caratterizzati dal solo interessamento delle cellule epiteliali, ma presentano contemporaneamente rilevanti modificazioni numeriche, morfologiche ed immunoistochimiche anche a carico delle cellule mioepiteliali e stromali.

Se si passa ad un'analisi più particolareggiata dei reperti, le cellule epiteliali tumorali del gatto, mentre manifestano una moderata attenuazione della positività per PAN-Ck nella sequenza che va dalla normalità alla iperplasia/displasia, ai tumori benigni ed ai tumori maligni, possono nel contempo acquisire reattività nuove, come in parte già rilevato da Ivanyi *et al.* (1992 e 1993) e da Martin de las Mulas *et al.* (1994 b): nei tumori benigni diventano in parte positive per Vimentina e nei tumori maligni lo sono spesso sia per

Vimentina che per Ck 14, come se - sdifferenziandosi sempre più - fossero in grado di elaborare proteine citoscheletriche uguali a quelle delle cellule mioepiteliali e delle cellule embrionarie progenitrici di entrambe. Le cellule mioepiteliali basali dei tumori mammari felini tendono anch'esse a scomparire in seguito alla trasformazione neoplastica degli epiteli luminali soprastanti, non diversamente da quanto si è già constatato nei tumori mammari canini semplici (Mandelli *et al.* 1998) e, prima ancora, nei tumori mammari della donna (Hamperl 1971, Bussolati *et al.* 1980, Gusterson *et al.* 1982, Sternlicht e Barsky 1997), inducendo gli oncologi umani ad ipotizzare che il mioepitelio basale possa svolgere un ruolo di contenimento nei confronti delle cellule epiteliali neoplastiche; scomparendo le cellule mioepiteliali basali, scompaiono ovviamente anche le immunomarcature corrispondenti. Per contro, nei due soli casi di tumore complesso inclusi nel nostro materiale di ricerca (un adenoma complesso ed un carcinoma solido complesso), il mioepitelio proliferante ha espresso in pieno le sue proprietà, risultando soprattutto positivo per Ck 14, α -smAct e Vimentina.

Le cellule del connettivo peritumorale e settale, ferma restando la loro positività per Vimentina, hanno manifestato scarsi cambiamenti tra i reperti mammari normali e quelli iperplastico/displastici, rivelando invece un crescente grado di positività per alfa-smAct nei tumori benigni e soprattutto in quelli maligni e consentendo di evidenziarvi, ancora più che nei tumori mammari canini, una forte prevalenza di miofibroblasti tra gli elementi cellulari dello stroma

In conclusione, si conferma che nella ghiandola mammaria felina la trasformazione neoplastica è accompagnata da importanti modificazioni a carico di tutti gli elementi cellulari presenti. Analogamente a quanto da noi prospettato per i tumori mammari del cane, alcune di queste modificazioni, in particolare la progressiva scomparsa del mioepitelio basale, la positivizzazione dell'epitelio neoplastico per Vimentina e per Ck 14 nonché la comparsa di un grande numero di elementi miofibroblastici nello stroma neoplastico, meritano di essere sottoposti ad attento studio ai fini di una loro possibile utilizzazione come markers di malignità.

BIBLIOGRAFIA

1. Bussolati G, Botta G, Gugliotta P: Actin-rich (Myoepithelial) cells in ductal carcinoma-in situ of the breast. *Virchow Arch.* **34**, 251-259, 1980.
2. Gusterson BA, Warburton MJ, Mitchell D, Ellison M, Neville AM, Rudland PS: Distribution of myoepithelial cells and basement membrane proteins in the normal breast and in the benign and malignant breast diseases. *Cancer Res.* **42**, 4763-4770, 1982
3. Hampe JF, Misdorp W: Tumors and dysplasias of the mammary gland. *Bulletin of the World Health Organisation* **50**, 111-134, 1974
4. Hamperl H: The myoepithelia (myoepithelial cells) – normal state; regressive changes; hyperplasia; tumors. *Current Topics in Pathol.* **53**, 161-220, 1971
5. Ivanyi D, Minke JM, Hageman C, Groeneveld E, van Doornewaard G: Patterns of expression of feline cytokeratins in healthy epithelia and mammary carcinoma cells. *Am. J. Vet. Res.* **53**, 304-314, 1992
6. Ivanyi D, Minke JM, Hageman C, Groeneveld E, van Doornewaard G, Misdorp W: Cytokeratins as markers of initial stages of squamous metaplasia in feline mammary carcinomas. *Am. J. Vet. Res.* **54**, 1095-1102, 1993
7. Mandelli G, Faustino AMR, Marchesi FJ, Sironi G, Veronesi MC, Luvoni GC: Espressione di α -actina, citocheratina 14 e vimentina in mammelle normali, iperplastiche e neoplastiche di cane. *Atti S.I.S.Vet* **52**, 143-144, 1998

8. Martin de las Mulas J, Espinosa de los Monteros A, Carrasco L, Sierra MA, Vos JH: Immunohistochemical distribution of vimentin, desmin, glial fibrillary acidic protein and neurofilament proteins in feline tissues. *J. Vet. Med.* **41**, 1-15, 1994 a
9. Martin de las Mulas J, Espinosa de los Monteros A, Bautista MJ, Gomez-Villamandos JC, Morales C: Immunohistochemical distribution pattern of intermediate filament proteins and muscle actin in feline and human mammary carcinomas. *J. Comp. Pathol.* **111**, 365-381, 1994 b
10. Moore AS, Madewell BR, Lund JK: Immunohistochemical evaluation of intermediate filament expression in canine and feline neoplasms. *Am. J. Vet. Res.* **50**, 88-92, 1989
11. Sternlicht M.D., Barsky S.H. The myoepithelial defense: a host defense against cancer. *Med. Hypotheses* **48**, 37-46, 1997

EVIDENZIAMENTO IMMUNOISTOCHEMICO DELLA PROTEINA p53 IN ALCUNI ANIMALI DOMESTICI. PROVE TECNICHE COMPARATIVE

Riccaboni P., Sironi G.

Istituto di Anatomia patologica veterinaria e Patologia aviaria. Università degli Studi di Milano

INTRODUZIONE

Nei vent'anni successivi alla scoperta del gene oncosoppressore p53, si è sviluppato sempre più un ampio settore della ricerca oncologica volto allo studio delle alterazioni di tale gene nelle cellule neoplastiche. Le sue alterazioni, da oltre un decennio considerate le più frequentemente riscontrabili nelle neoplasie maligne dell'uomo, possono essere studiate con tecniche di analisi molecolare, immunocitochimica e sierologica (Soussi et al., 1994). Le indagini finora condotte con metodiche proprie della biologia molecolare hanno studiato le alterazioni biochimiche e geniche responsabili di anomalie funzionali della proteina p53. Altro approccio, più proprio dei patologi morfologi è quello che indaga, con l'ausilio di tecniche immunocitochimiche il come, il dove ed il quanto le alterazioni funzionali della proteina p53 si rendono visibili in forma di sovraespressione. Inizialmente, l'accumulo intranucleare di proteina p53 era esclusivamente considerato frutto di mutazioni geniche ma, con la progressiva acquisizione di nuove conoscenze, il binomio *sovraespressione = mutazione* ha perso valenza assoluta pur restando sempre da considerarsi l'ipotesi più probabile. In più circostanze è stato ricordato che la correlazione tra sovraespressione e mutazione, seppur stretta, è raramente assoluta e che la sovraespressione di proteina p53 assume il puro significato di presenza, a prescindere dalla causa, di alterazione funzionale della proteina stessa (Winford-Thomas, 1992; Hall e Lane, 1994). Tenuta presente questa premessa, l'esame immunocitochimico resta un approccio che consente di indagare la presenza di tali alterazioni in modo semplice e rapido. Diversi fattori rendono vari i protocolli di indagine utilizzati: anticorpi mono- o policlonali di diverso tipo, differenti procedure di smascheramento antigenico che, per varietà delle soluzioni e delle sorgenti di calore impiegate, possono portare a risultati talvolta differenti e comunque tra loro non sempre raffrontabili. Tale problema, già di per se evidente in campo umano, assume ancora maggior importanza in oncologia veterinaria, se si tiene conto che nessuno degli anticorpi disponibili è specificatamente diretto contro la proteina p53 degli animali domestici. E' sulla base di tali considerazioni che abbiamo voluto confrontare differenti metodiche di evidenziazione immunocitochimica della proteina p53 in tumori di alcune delle più diffuse specie domestiche.

MATERIALI E METODI

Il materiale di studio è costituito da campioni fissati in formalina ed inclusi in paraffina, di neoplasie spontanee di cane (3 campioni: osteosarcoma, tumore misto maligno e carcinoma squamoso), gatto (4

campioni: un carcinoma squamoso, due adenocarcinomi mammari ed un carcinoma transizionale della vescica), cavallo (4 casi: una leucosi megacariocitica e tre carcinomi squamosi) e bovino (carcinoma squamoso). I campioni sono stati selezionati da più ampia casistica, precedentemente indagata, in quanto positivi in vario grado ad esame immunohistochimico per p53 realizzato con un anticorpo primario (PAb240) che riconosce un epitopo presente in ciascuna delle specie considerate (Soussi, 1999). Sezioni di ogni campione sono state esaminate con la tecnica immunohistochimica ABC secondo differenti protocolli che prevedevano l'uso dell'anticorpo monoclonale PAb240 e del policlonale CM1 e, limitatamente ai campioni di cavallo, anche dell'anticorpo monoclonale DO12 che riconosce nell'uomo un epitopo presente anche nella proteina p53 equina (Vojtesek *et al.*, 1995). Per ciascun anticorpo si è ricorsi a differenti tecniche di smascheramento antigenico che prevedevano alternativamente l'uso di soluzione di urea (6M), tampone citrato (pH 6 e 0,01M) o di una soluzione commerciale (*Buffer for antigen Retrieval, DAKO*) per 10' in pentola a pressione. Fa eccezione l'anticorpo PAb240 che è stato impiegato su sezioni trattate solo con urea, in quanto precedenti prove preliminari avevano dimostrato l'inefficacia degli altri trattamenti.

Dell'immunocolorazione sono state valutate separatamente la distribuzione e l'intensità ed inoltre, con l'intento di quantificare anche gli aspetti negativi legati alla scelta di un anticorpo e/o di una tecnica di smascheramento, sono state valutate le reazioni dubbie della marcatura eventualmente presenti nelle cellule neoplastiche (colorazione nucleolare, o citoplasmatica) o aspecifiche nei tessuti normali. Circa il grado di positività, nelle cellule neoplastiche, sono state considerate 4 classi: negativi (-), assenza di reattività nucleare; moderatamente positivi (+) con percentuale di nuclei positivi stimabile inferiore al 10%; positivi (++), con percentuale di reattività stimata fra 11% e 50% e molto positivi (+++), quando la positività nucleare riguardava almeno il 50% delle cellule neoplastiche. L'intensità della colorazione è stata soggettivamente valutata ed i campioni sono stati quindi suddivisi in 3 categorie: negativi (-); debole marcatura (+) e marcatura intensa (++) . Le aspecificità della immunocolorazione, eventualmente presenti nei campioni, sono state annotate schematicamente come assenza (-) o presenza più o meno abbondante ed intensa (±, +, ++).

RISULTATI

I risultati del presente lavoro vengono riportati sinteticamente, suddivisi per specie, in forma di tabella (Tabb. I-IV).

Tab I: risultati relativi ai campioni di cane

| CASO | Ab. | Sol. | Distr. | Int. | Reazioni dubbie e/o aspecifiche | |
|------|--------|------|--------|------|---------------------------------|--------------------|
| | | | | | cellule neoplastiche | tessuti normali |
| 1 | PAb240 | U | +++ | + | + nucleolare | |
| | CM1 | U | ++ | + | ++ nucleolare | |
| | CM1 | Cit | - | - | ± citoplasmatica | |
| | CM1 | Dako | - | - | ± citoplasmatica | |
| 2 | PAb240 | U | +++ | ++ | + nucleolare | |
| | CM1 | U | ++ | + | + nucleol.; + citopl. | ± cellule stromali |
| | CM1 | Cit | ++ | + | + nucleol.; + citopl. | |
| | CM1 | Dako | ++ | + | ++ citoplasmatica | |
| 3 | PAb240 | U | +++ | ++ | | |
| | CM1 | U | +++ | ++ | | ± diffuso |
| | CM1 | Cit | +++ | ++ | ± citoplasmatica | ± diffuso |
| | CM1 | Dako | +++ | ++ | | ± diffuso |

1) osteosarcoma mammario; 2) tumore misto maligno mammario; 3) carcinoma squamoso

Tab II: risultati relativi ai campioni di gatto

| CASO | Ab. | Sol. | Distr. | Int. | Reazioni dubbie e/o aspecifiche | |
|------|--------|------|--------|------|---------------------------------|-----------------------------|
| | | | | | cellule neoplastiche | tessuti normali |
| 1 | PAb240 | U | +++ | + | | ± diffuso |
| | CM1 | U | +++ | + | ++ citoplasmatica | ++ diffuso ++ epidermide |
| | CM1 | Cit | +++ | + | ++ citoplasmatica | ++ diffuso ++ epidermide |
| | CM1 | Dako | +++ | + | ++ citoplasmatica | ++ diffuso ++ epidermide |
| 2 | PAb240 | U | ++ | ++ | | |
| | CM1 | U | ++ | + | ± nucleolare | ± stroma |
| | CM1 | Cit | - | - | | |
| | CM1 | Dako | - | - | | |
| 3 | PAb240 | U | + | + | + nucleol.; + citopl. | |
| | CM1 | U | + | + | | + diffuso |
| | CM1 | Cit | + | + | + citoplasmatica | + diffuso |
| | CM1 | Dako | + | + | + citoplasmatica | + diffuso |
| 4 | PAb240 | U | +++ | + | | |
| | CM1 | U | +++ | -/+ | + nucleol.; + citopl. | + diffuso |
| | CM1 | Cit | + | -/+ | + nucleolare | + diffuso |
| | CM1 | Dako | + | -/+ | + nucleolare | + diffuso |

1) carcinoma squamoso; 2 e 3) adenocarcinoma semplice mammario; 4) carcinoma transizionale vescicale

Tab III: risultati relativi ai campioni di cavallo

| CASO | Ab. | Sol. | Distr. | Int. | Reazioni dubbie e/o aspecifiche | |
|------|--------|------|--------|------|---------------------------------|-----------------|
| | | | | | cellule neoplastiche | tessuti normali |
| 1 | PAb240 | U | +++ | ++ | | |
| | DO12 | U | +++ | ++ | | |
| | DO12 | Cit | ++ | + | | |
| | DO12 | Dako | - | - | | |
| | CM1 | U | +++ | ++ | | + muscolatura |
| | CM1 | Cit | +++ | + | ± citoplasmatica | + muscolatura |
| | CM1 | Dako | +++ | ++ | ± citoplasmatica | + muscolatura |
| 2 | PAb240 | U | +++ | ++ | | |
| | DO12 | U | +++ | ++ | | |
| | DO12 | Cit | +++ | + | | |
| | DO12 | Dako | - | - | | |
| | CM1 | U | +++ | + | | + diffuso |
| | CM1 | Cit | +++ | ++ | | + diffuso |
| | CM1 | Dako | +++ | ++ | | + diffuso |
| 3 | PAb240 | U | ++ | + | | |
| | DO12 | U | ++ | + | | |
| | DO12 | Cit | - | - | | |
| | DO12 | Dako | - | - | | |
| | CM1 | U | ++ | + | + nucleolare | + diffuso |
| | CM1 | Cit | ++ | + | + citoplasmatica | + diffuso |
| | CM1 | Dako | +++ | + | ++ citoplasmatica | + diffuso |
| 4 | PAb240 | U | +++ | ++ | | |
| | DO12 | U | +++ | ++ | | |
| | DO12 | Cit | - | - | | |
| | DO12 | Dako | - | - | | |
| | CM1 | U | +++ | ++ | | + diffuso |

1) leucosi megacariocitica; 2, 3, 4) carcinoma squamoso

Tab IV: risultati relativi al campione di carcinoma squamoso bovino

| CASO | Ab. | Sol. | DISTR. | Int. | Reazioni dubbie e/o aspecifiche | |
|------|--------|------|--------|------|---------------------------------|-----------------|
| | | | | | cellule neoplastiche | tessuti normali |
| 1 | PAb240 | U | +++ | + | | |
| | CM1 | U | +++ | + | + nucleol.; + citopl. | |
| | CM1 | Cit | +++ | + | + citoplasmatica | + diffuso |
| | CM1 | Dako | +++ | + | + nucleol.; + citopl. | + diffuso |

Legenda: Ab. = anticorpo; Sol. = soluzione impiegata per lo smascheramento antigenico;
Distr. = distribuzione della positività; Int. = intensità dell'immunomarcatura

DISCUSSIONE

Dall'esame dei risultati si desume che nelle varie specie, sensibilità e specificità dell'indagine immunohistochimica per proteina p53 possono variare in relazione a vari fattori quali l'anticorpo e la soluzione di smascheramento impiegati. Non è escluso che, come dimostrato nell'uomo, anche la fissazione possa influire significativamente sul risultato. Per quanto concerne le singole specie, nel gatto l'anticorpo policlonale CM1 dà risultati peggiori di quelli ottenuti con il monoclonale PAb240. La marcatura, con il primo anticorpo, è talvolta più debole e, quasi costantemente, sono presenti un segnale aspecifico nei tessuti normali ed una marcatura prevalentemente nucleolare o citoplasmatica di dubbio significato nelle cellule neoplastiche. Con CM1, nel cane e nel bovino, i risultati sono lievemente migliori rispetto al gatto; anche se non comparabili con quanto ottenuto con PAb240. Resta però da segnalare che, secondo la nostra esperienza, anche quest'ultimo anticorpo non ha mai fornito, per intensità del segnale e assenza di aspecificità, i risultati normalmente osservati nelle altre specie. Comparativamente alle altre specie, il cavallo è quello in cui, indipendentemente dall'anticorpo utilizzato, si ottengono i migliori risultati. Essi si possono ritenere, per intensità di marcatura e assenza di aspecificità, ottimali con PAb240 e DO12 ma comunque soddisfacenti con CM1. L'anticorpo DO12, tuttavia, risulta inefficace quando usato con il tampone commerciale Dako e dà risultati meno buoni quando lo smascheramento è effettuato con tampone citrato, poiché la marcatura perde di intensità e, in qualche caso, scompare completamente. Sempre in tema di soluzioni di smascheramento appare chiaro che l'urea ha un maggior potere smascherante, ma tale sua azione, necessaria per l'anticorpo PAb240 ed ottimale per il DO12, non procura vantaggi se impiegata con l'anticorpo CM1. Inoltre, considerando che l'urea, per la sua natura proteolitica, determina più spesso danneggiamento o distacco delle sezioni, lo smascheramento più idoneo per l'anticorpo CM1, sembrerebbe quello che impiega il tampone citrato o la soluzione commerciale. Se si considera l'ampia variabilità dei risultati ottenibili nelle varie specie, è quindi sempre di primaria importanza la scelta del protocollo più opportuno. Attualmente sono note le sequenze complete di p53 di cane, gatto e bovino e parziale di cavallo e ciò dovrebbe consentire di effettuare scelte mirate almeno tra gli anticorpi monoclonali disponibili.

BIBLIOGRAFIA

1. Hall PA e Lane DP: p53 in tumour pathology: can we trust immunohistochemistry? – Revisited! *J. Pathol.* **172**, 1-4, 1994.
2. Soussi T, Legros Y, Lubin R, Ory K, Schlichtholz B: Multifactorial analysis of p53 alteration in human cancer: a review. *Int. J. Cancer* **57**, 1-9, 1994.
3. Soussi T: p53 monoclonal antibodies. http://perso.curie.fr/Thierry.Soussi/p53_pagemab1.html.

4. Vojtesek B, Dolezalova H, Lauerova L, Svitakova M, Havlis P, Kovarik J, Midgley CA, Lane DP: Conformational changes in p53 analyzed using new antibodies to the core DNA binding domain of the protein. *Oncogene* **10**, 389-393, 1995.
5. Wyndford-Thomas D: p53 in tumour pathology: can we trust immunohistochemistry? *J. Pathol.* **166**, 329-330, 1992.

COMPLESSO IPERTROFIA MAMMARIA-FIBROADENOMA NEL GATTO: OSSERVAZIONI ANATOMO-ISTOPATOLOGICHE E IMMUNO-ISTOCHEMICHE.

Pirino S., Pau S., Zedda M.T., Sanna E., Leoni A., Nieddu A.M., Mura A.* Bronzini R.*

Istituto di Patologia Generale, Anatomia Patologica e Clinica Ostetrico-Chirurgica Veterinaria

*Istituto di Anatomia e Istologia Patologica - Facoltà di Medicina e Chirurgia. Università degli Studi di Sassari

INTRODUZIONE

Il "complesso ipertrofia mammaria-fibroadenoma" (MH-FC) è una mastopatia caratterizzata da una proliferazione displastico/neoplastica degli acini, dei dotti e dello stroma mammario con rapido e considerevole aumento di volume dell'organo. Essa è stata descritta per la prima volta con il nome di "*ipertrofia mammaria felina*" (Allen *et al.*, 1973) e successivamente segnalata da vari AA. con le denominazioni di "*epiteliosi*" (Hampe *et al.*, 1974), "*iperplasia fibroadenomatosa*" (Mandel *et al.*, 1974), "*complesso ipertrofia mammaria felina/fibroadenoma*" (Hayden *et al.*, 1981), "*ipertrofia mammaria benigna*" (Mandelli *et al.*, 1984), e "*mastopatia fibro-adenomatosa*" (Cristarella *et al.*, 1995). Le varianti cistiche papillari sono state riportate come "*ipertrofia papillare cistica*" (Hinton e Gaskell, 1977) e "*iperplasia fibroepiteliale papillare intraduttale*" (Dorn *et al.*, 1983).

La patologia, di cui sono stati descritti casi di regressione spontanea (Mandel *et al.*, 1973) non è correlata a fattori di razza ma tende a manifestarsi soprattutto in soggetti di età inferiore ai 2 anni. In realtà, il complesso fibroadenoma-ipertrofia mammaria sembra dipendere dalla stimolazione endogena e/o esogena di tipo progestinico: esso si riscontra infatti in gatte gravide (Allen *et al.*, 1973; Hinton e Gaskell, 1977; Hayden *et al.*, 1981) o con falsa gravidanza (Allen *et al.*, 1973; Hayden *et al.*, 1981) e in gatte intere a seguito a somministrazione di alte dosi di progestinici per la soppressione dei calori o per problemi dermatologici (Allen *et al.*, 1973; Mandel, 1975). La malattia è stata riscontrata anche nei soggetti castrati, femmine e maschi, sottoposti a terapie progestiniche (Hinton e Gaskell, 1977; Hayden *et al.*, 1981; Bethlem e van der Luer, 1983; Dorn *et al.*, 1983) e perfino in un maschio intero di 12 mesi trattato con Ciproterone acetato (Cristarella *et al.*, 1995).

Casi di MH-FC sono stati segnalati anche nella cagna (Mandelli e Finazzi, 1983; Cristarella *et al.*, 1996). Uno studio condotto da Hayden (1981) per ricercare recettori cellulari per estrogeni e progesterone evidenziò solo recettori per il progesterone.

MATERIALI E METODI

Il materiale esaminato apparteneva a 6 gatti (5 femmine ed 1 maschio), presentati presso l'ambulatorio di Clinica Ostetrica dell'Istituto, più due reperti inviati da liberi professionisti per

accertamenti istopatologici. I dati relativi all'anamnesi ed all'esame obiettivo particolare dell'apparato mammario e genitale dei soggetti e la terapia praticata sono riassunti in tabella 1. Campioni di tessuto mammario e linfonodi tributari sono stati fissati in formalina al 10%, tamponata con carbonato di calcio, inclusi in paraffina, sezionati e sottoposti a colorazione con Ematossilina Eosina (E.E.), Bleu di Toluidina, Tricromica di Masson. Le sezioni sono state inoltre sottoposte a processazione immunohistochimica con la tecnica di ABC immunoperossidasi previa incubazione con anticorpi monoclonali (anti-pan citocheratine -clone KL1- diluizione 1:900, anti-recettore umano per progesterone -clone 1A6- diluizione 1:100, anti-recettore umano per estrogeni -clone 1D5- diluizione 1:100, anti-vimentina -clone V9- diluizione 1:40, anti- α actina della muscolatura liscia -clone 1A4- diluizione 1:500) e policlonali (anti-proteina S100 diluizione 1:3500 e anti-testosterone diluizione 1:80). Per rendere maggiormente disponibili i determinanti antigenici le sezioni da saggiare con anti-citocheratine sono state trattate per 30', a temperatura ambiente, con pepsina all'1% in HCL 0,01 N; mentre quelle da cimentare con gli altri anticorpi anti-(estrogeni e progesterone) sono stati irradiate con microonde per 19 minuti alla potenza di 350 Watt previa immersione in tampone citrato 0,1 Mol/l a pH 6. Tutte le sezioni sono state lavate per 10' in tampone fosfato e incubate per 60' a temperatura ambiente con un anticorpo secondario biotinato diluito 1/200; la reazione colorimetrica è stata svelata con la 3,3-diamminobenzidina tetraidrocloride. I preparati sono stati contrastati con Emallume di Mayer per l'evidenziazione dei nuclei.

RISULTATI

Le linee mammarie erano interessate sempre bilateralmente con coinvolgimento spesso totale delle mammelle. Queste si presentavano tumefatte, rotondeggianti e di dimensioni variabili da 2,5 a 7 cm.. La cute era, in alcuni casi, iperemica in vicinanza dei capezzoli. La superficie di taglio era di aspetto rosato, "simil mixomatoso" e ricca di vasi.

L'esame istopatologico evidenziava un'abbondante proliferazione di strutture epiteliali riferibili a componente ghiandolare (alveoli e dotti) immerse nel tessuto connettivo. Quest'ultimo, predominante rispetto al parenchima interstiziale, si presentava a trama lassa fuso con banderelle di collagene maturo interposte ai lobuli. La componente cellulare era costituita da fibroblasti immersi in abbondante sostanza fondamentale ricca di mucopolisaccaridi acidi, come dimostrato dalla reazione metacromatica dopo colorazione con bleu di Toluidina 1%.

I linfonodi tributari erano nella norma.

L'analisi dei risultati immuno istochimici evidenziava nel complesso i seguenti dati:

- Anti Actina L – positività ben evidente per le cellule mioepiteliali, per le cellule basali dei dotti e per la muscolatura liscia;
- Anti Vimentina – positività per le cellule stromali ed in particolare per i fibroblasti e per le cellule endoteliali; moderata quella per le cellule muscolari lisce;
- Anti proteina S 100 – buona positività, specifica per le cellule mioepiteliali e basali dei dotti;
- Anti Testosterone – costante negatività;
- Anti Recettori per Estrogeni – debole positività a livello citoplasmatico, rara a livello nucleare per gli epitelii alveolari e duttali;
- Anti Recettori per Progesterone – debole positività a livello citoplasmatico, incostante a livello nucleare per gli epitelii alveolari e duttali e rara per le cellule stromali;
- Anti Pan Citocheratine – intensa positività per l'epitelio alveolare, il mioepitelio, l'epitelio duttale e basale dei dotti.

DISCUSSIONE

La nostra casistica, seppure non ampia, è tuttavia, considerata la rarità dell'affezione, numericamente non trascurabile; essa comprende, inoltre, una molteplicità di situazioni (femmine gravide [2] o in falsa gravidanza con piometra [1], gatte gravide trattate durante il calore con progestinico [1], gatte trattate con progestinico per sopprimere il calore [2] e gatti maschi orchiettomizzati e trattati con progestinico [1]).

Da evidenziare la giovane età della maggioranza dei soggetti (10-13 mesi), riscontro per altro in linea con quanto già riportato da altri AA.

In tutti i casi esaminati è stato riscontrato un quadro istopatologico tipico del complesso Fibroadenoma- iperplasia mammaria.

Gli accertamenti immuno istochimici hanno evidenziato la presenza (benché modica) di recettori per il progesterone e per gli estrogeni. Tale dato si discosta da quanto osservato da Hayden (1981) che, avvalendosi di una tecnica radioimmunologica, aveva evidenziato esclusivamente recettori per il progesterone.

Non risultano differenze tra maschio e femmine per quanto riguarda l'evidenziazione dei recettori ormonali a livello mammario. A tal proposito va tenuto presente che l'unico maschio studiato era stato sottoposto ad orchietomia e trattato con progestinico 36 giorni prima della mastectomia; di conseguenza, le mammelle avevano subito l'influsso dell'ormone esogeno femminile per lungo tempo. Inoltre, poiché le nostre osservazioni si riferiscono ad uno stadio avanzato di MH-FC, si potrebbero supporre modifiche dei quadri istopatologici e dei recettori steroidei nel decorso della mastopatia. Per quanto riguarda l'eziopatogenesi non sarebbe da escludere l'ipotesi di una

predispozione genetica considerata la stretta parentela (sorelle) tra due soggetti (n° 4 e 5) che quasi in contemporanea avevano manifestato ipertrofia mammaria.

Tabella 1

| gatto n° | età | Sesso | razza | anamnesi e stato presente | mammelle interessate |
|----------|---------|-------|----------------|--|----------------------------------|
| 1 | 12 mesi | F | comune europeo | Gravida (30 giorni circa) | Sn: M. 1-2-3-4 Dx: M. 1-2-3-4 |
| 2 | 10 mesi | F | comune europeo | Gatta con piometra aperta, accoppiata circa 30 giorni prima | Sn: M. 2-3 Dx: M. 2-3 |
| 3 | 10 mesi | M | comune europeo | Orchiectomia + M.A.* (20 mg. i.m.) per inibirne la demarcazione del territorio | Sn: M. 1-2-3-4 Dx: M. 1-2-3-4 |
| 4 | 13 mesi | F | comune europeo | Trattata con M.A.P.● (s.c.) durante il calore gravida (45 giorni circa) | Sn: M. 1-2-3-4 Dx: M. 1-2-3-4 |
| 5 | 13 mesi | F | comune europeo | Sorella della gatta n° 4 , gravida (30 giorni circa) | Sn: M. 1-2 Dx: M. 3 |
| 6 | 11 mesi | F | persiano | Soppressione del calore un mese prima con megestrolo acetato (s.c.) | Sn: M. 1-2-3-4 Dx: M. 1-2-3-4 |
| 7 | ---- | F | comune europeo | ----- | Sn: M1-2-3-4 Dx: M1-2-3-4 |
| 8 | 2 anni | F | comune europeo | Trattata con M.A. * (s.c.) per inibire la comparsa dei calori | Sn: M. 1-2-3-4 Dx: M. 1-2-3-4 |

* M.A. (megestrol acetato)

● M.A.P. (medrossiprogesterone acetato)

BIBLIOGRAFIA

- Allen HL. Feline mammary hypertrophy. *Vet. Pathol.*, **10**:501-508, 1973.
- Bethlem M, van der Luer RJ. Feline fibro-epithelial hyperplasia in 3 castrated tomcats following treatment with progestagens. *Tijdschr Diergeneeskd*, **118**:650-652, 1993;
- Corrò M.: Diagnosi istopatologica delle neoplasie mammarie del cane e del gatto, *Boll. Ass. It. Vet. Piccoli Animali*, **1**:37-49, 1991;
- Cristarella S, Ferro D, Scirpo A, Gimbo A. Mastopatia fibroadenomatosa da abuso progestageneo (Ciproterone) nel gatto maschio. *Atti A.S.Sa.V.*, **2**:20-21, 1995;
- Cristarella S, Ferro D, Scirpo A, Gimbo A. Mastopatia fibro-adenomatosa da abuso progestageneo (Medrossiprogesterone acetato) nella cagna. *Atti S.I.S.Vet.*, **50**:115-117, 1996;
- Dorn AS, Legendre AM, Mc Gavin MD. Mammary hyperplasia in a male cat receiving progesterone. *JAVMA*, **182**:621-622, 1983;
- Hampe JF, Misdorp W. Tumors and dysplasias of the mammary gland. *Bull. Org. Mond.San.*, **50**:111-133, 1974;
- Hayden DW. Morphologic changes in the mammary gland of Megestrol acetate - treated and untreated cats: a retrospective study. *Vet. Pathol.*, **26**:104-113, 1980;
- Hayden DW, Johnson KH, Ghobrial HK. Ultrastructure of mammary hypertrophy. *Vet. Pathol.*, **20**, 254-264, 1983;
- Hayden DW, Johnston SD, Riang DT, Johnson KH, Barnes DM. Feline mammary Hypertrophy / Fibroadenoma complex: clinical and ormonal aspects. *Am. J. Vet. Res.*, **42**:1699-1703, 1981;
- Hinton M, Gaskell CJ. Non-neoplastic mammary hypertrophy in the cat associated either with pregnancy or with oral progestagen therapy. *Vet. Rec.*, **100**:277-280, 1977;

12. Mandelli G, Finazzi M. Histopathologische Befunde bei dem Milchdrüsen-Hipertrophie-Fibroadenomkomplex der Katze. *Dtsch. tierarztl. Wschr.*, **90**:459-502, 1983;
13. Mandelli G, Finazzi M, Cairoli F. Reperti istologici riferibili al complesso ipertrofia mammaria-fibroadenoma nella cagna. *Atti S.I.S.Vet*, **38**:580-583., 1984;
14. Mandel M. Benign mammary hypertrophy. *Vet. Med., S.A.C.*, **70**:846-847, 1975;
15. Nimmo JS, Plummer JM: Ultrastructural studies of fibroadenomatous hyperplasia of mammary glands of 2 cats. *J. Comp. Path*, **91**:41-50, 1981.

IL SEMINOMA NEL CAVALLO. STUDIO RETROSPETTIVO ED ESPERIENZA CLINICA

Sanna Passino E*, Careddu G.M., Cherchi R.°, Pirino S.^, Muzzetto P.

Clinica Chirurgica Veterinaria; ^Anatomia Patologica Veterinaria – Università degli Studi di Sassari;

° Istituto Incremento Ippico della Sardegna - Ozieri)

Abstract

Clinical, echographic and histopathological aspects of monolateral seminoma in a horse are reported. The subject showed reduced libido and abnormal spermatogram. The affected testicle was smaller compared with the controlateral and hypoechoic areas were present in the parenchima. Histological examination confirmed the presumptive diagnosis of seminoma.

INTRODUZIONE

I tumori testicolari vengono segnalati comunemente nell'uomo e nel cane mentre rappresentano una patologia relativamente rara nel cavallo. I casi documentati nel mondo, infatti, sono scarsi. Un importante studio retrospettivo di SCHOMBAUER ha messo in evidenza come, almeno sino al 1983, i casi di tumore del testicolo fossero segnalati raramente e con poca precisione (MISDORP, UBERREITER, BALL, CORSY e NIIMI riportano i loro casi, con una diagnosi presuntiva e senza alcuna classificazione attendibile). Citando la sua casistica (1000 cavalli ed oltre 4000 organi e tumori esaminati presso l'Istituto di Anatomia Patologica Veterinaria di Vienna negli anni 1958-1982 - soltanto tre cavalli sono risultati affetti da seminoma) lo stesso Autore conclude affermando che non si può dare per scontato che tutti i seminomi riportati nella molteplice e vecchia letteratura siano da considerare come tali. In questo contesto assume una posizione particolare il caso riportato da MATTHIAS che, per la sua precisa descrizione, almeno fino al 1982 può essere considerato l'unico seminoma intratubulare descritto nel cavallo, secondo la nomenclatura World Health Organisation.

Segnalazioni più recenti sono quelle di BECHT (1 caso J.A.V.M.A., 1979), TRIGO (2 casi Vet. Pathol., 1984), SMITH (1 caso J.A.V.M.A., 1989), HUNT (2 casi J.A.V.M.A., 1990) e VALENTINI (1 caso, Ippologia 1994) quasi sempre relative a singoli casi criptorchidi.

Il seminoma origina, con multipli focolai d'insorgenza, dalle cellule della serie spermatogenica, presumibilmente dalla linea della spermatogonia basale. E' dotato di notevole invasività locale e, spesso, produce metastasi a carico dei linfonodi sottolombari, della vena cava caudale e della porzione addominale dell'aorta, del mesentere e del lobo sinistro del fegato. Colpisce i soggetti più anziani, soprattutto i criptorchidi e, nella maggior parte dei casi, si presenta in forma monolaterale.

Dal punto di vista istologico VALENZA distingue una forma intratubulare ed una forma diffusa: sembra ormai certo che la forma intratubulare rappresenti il primo stadio di sviluppo del tumore e sia quindi comune anche alla forma diffusa nella quale, la precoce rottura dei tubuli, permette la formazione di spessi strati di cellule quasi privi di stroma.

Il criptorchidismo rappresenta una condizione fortemente predisponente per l'insorgenza del seminoma, sia nel cavallo che nell'uomo e nel cane. Inoltre, costituisce un elemento determinante nel rilevamento clinico della neoplasia, dal momento che la maggior parte delle segnalazioni della neoplasia riguardano stalloni portati a visita per colica da torsione del funicolo spermatico o comunque da una complicazione della condizione di criptorchide.

Poiché la bibliografia riporta quasi esclusivamente casi di seminoma in prevalenza a carico di testicoli ritenuti il rilevamento di un caso di neoplasia in un testicolo eutopico ci ha indotto a questa segnalazione.

CASO CLINICO

Si tratta di uno stallone anglo-arabo di 19 anni, utilizzato come riproduttore in una stazione di monta. L'anamnesi remota riferisce che il soggetto, in buone condizioni generali, non mostrava alcun sintomo riconducibile a patologie in atto ed era dotato, in relazione alla sua età, di ottima libido e di buona fertilità. L'apparato genitale si presentava normalmente sviluppato e funzionale e non erano presenti condizioni di idrocele o altre patologie che ne alteravano il volume dei testicoli. Le caratteristiche dello sperma rientravano nei limiti della norma.

Nel corso dell'ultima campagna di fecondazione, invece, il cavallo ha manifestato una marcata riduzione del volume del testicolo sinistro ed una diminuzione della libido.

Lo spermiogramma ha rivelato un marcato calo delle caratteristiche complessive dello sperma. Circa l'80% delle fattrici coperte dallo stallone sono ritornate in calore. Più in dettaglio il comportamento alla monta era modificato con il tempo di reazione (tempo necessario al cavallo per raggiungere la piena erezione dal momento in cui vede la cavalla) aumentato, così come il numero di salti in vagina ed il tempo totale di raccolta (tabella 1 a).

Tabella 1 - Spermiogramma (a – b – c)

a) Esame del comportamento alla monta

| | |
|---------------------------|-----------|
| Tempo di reazione | Aumentato |
| Numero di salti in vagina | Aumentato |
| Tempo totale di raccolta | Aumentato |

L'esame dello sperma raccolto mediante vagina artificiale evidenziava un volume dello sperma gel-free normale, una concentrazione fotometrica ed ematimetrica notevolmente diminuita così come la motilità e la sopravvivenza del seme diluito a 5°C per 24 h addirittura assente a 48 h (tabella 1 – b).

**b) Esame dello sperma raccolto mediante vagina artificiale su fattrice
in estro**

| | |
|--|------------------------|
| Volume dello sperma gel-free | normale |
| Concentrazione fotometrica | notevolmente diminuita |
| Concentrazione ematimetrica | notevolmente diminuita |
| Motilità | diminuita |
| Sopravvivenza del seme diluito a 5°C per 24 h | notevolmente diminuita |
| Sopravvivenza del seme diluito a 5°C per 48 h | assente |
| Anomalie morfologiche | nella norma |

Le anomalie morfologiche erano nella norma ma le colorazioni Eosina-Nigrosina evidenziavano un aumento percentuale degli spermatozoi morti (tabella 1 c).

c) Colorazioni

| | |
|------------------|--|
| Eosina-Nigrosina | percentuale spermatozoi morti aumentata |
| MGG | - assenza di cellule rosse - rari linfociti - assenza di polimorfonucleati |

All'esame particolare dell'apparato genitale, il testicolo sinistro è apparso ipotrofico, di consistenza fibrosa e con la coda dell'epididimo leggermente ispessita; i rapporti gonade, epididimo e funicolo spermatico sono apparsi nella norma e la palpazione del testicolo non ha mai suscitato reazioni algiche.

L'esame ecografico, effettuato con un apparecchio Aloka 500 con sonde lineari da 5 e 7,5 Mhz ha evidenziato un testicolo sinistro del volume di 150 cm³, un'ecogenicità complessivamente diminuita con trama testicolare discretamente disomogenea. Nelle scansioni antero-laterali è stata osservata un'area ipoecogena rotondeggiante, di circa 3 cm nel suo asse maggiore, con lievi

infiltrazioni periferiche, piuttosto ben circoscritta anche per la presenza di un evidente margine iperecogeno. Piccole aree iperecogene erano presenti a livello della coda dell'epididimo. Il funicolo spermatico è apparso normale così come, per rapporti e densità ecografica, gli annessi scrotali. Il testicolo destro, invece, ha mostrato un volume di 280 cm³, con trama testicolare normale, di tessitura omogenea ed ecogenicità medio-alta. L'epididimo ed il funicolo spermatico si sono presentati regolari nelle varie componenti e normo-riflettenti.

L'assenza di elementi ecografici che depongano per un processo flogistico, confortata dai rilievi dell'anamnesi oltre che dell'esame clinico e dello sperma e la esclusione di una formazione cistica, solitamente di aspetto anecogeno e ben circoscritta, hanno consentito di formulare un'ipotesi diagnostica di neoplasia testicolare, in apparente contrasto con la sola ipotrofia dell'organo.

Il soggetto è stato sottoposto ad orchietomia monolaterale sinistra e la gonade è stata esaminata dal punto di vista anatomo-isto-patologico. L'intervento chirurgico, eseguito con l'animale in stazione e con la tecnica "a testicolo scoperto", non ha presentato alcuna difficoltà e non è stato seguito da alcuna complicazione.

Macroscopicamente il testicolo si presentava ipotrofico con l'albuginea fortemente ispessita e liscia. In sezione, nel contesto del parenchima, si evidenziavano numerose formazioni nodulari di dimensioni variabili da 3-4 mm. a 3 cm. di diametro, di colorito bianco-grigiastro.

All'esame istopatologico, eseguito con colorazioni E.E. e tricromica di Azan-Mallory, le formazioni risultavano costituite da cellule neoplastiche proliferate della linea germinale, spiccatamente grandi, poliedriche, con citoplasma scarso e moderatamente basofilo. I nuclei erano costantemente vescicolosi e polimorfi, con 1-2 nucleoli molto voluminosi. La trama connettivale risultava scarsa, mentre era sempre riconoscibile la ormai caratteristica infiltrazione linfocitaria a focolaio ben descritta da Nielsen e Lein, ritenuta patognomica. La tunica albuginea non appariva coinvolta dalla neoplasia.

Queste caratteristiche hanno consentito di classificare la neoplasia come seminoma di tipo diffuso, in accordo con la nomenclatura W.H.O.

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Fra le neoplasie della linea germinale, il seminoma è sicuramente la forma che presenta la maggiore incidenza nell'equino. Secondo una stima effettuata da Caron, infatti, la prevalenza di questa patologia, nei cavalli maschi interi, raggiunge lo 0,5 % . Il numero ridotto di segnalazioni di questa neoplasia, nel cavallo, potrebbe essere attribuito alla castrazione che, in proporzione alla longevità potenziale di questa specie, avviene in età giovanile.

Nel seminoma il testicolo raggiunge normalmente notevoli dimensioni, diventando rilevabile all'ispezione, al contrario di quello che avviene nel tumore delle cellule interstiziali che, spesso, passa inosservato per il fatto che non modifica le dimensioni della gonade.

Il caso da noi esaminato è sovrapponibile, per la maggior parte degli aspetti, a quanto descritto in bibliografia ma si caratterizza per la riduzione di volume della gonade.

L'ecografia, in associazione ai rilievi anamnestici, all'esame clinico ed allo spermogramma, ha consentito di formulare un'ipotesi diagnostica di neoplasia testicolare, in seguito confermata dall'esame istopatologico. Il tempestivo intervento chirurgico ha impedito la diffusione del tumore.

BIBLIOGRAFIA

1. Auer J.A. - Equine Surgery. Ed. W.B. Saunders, Philadelphia, 1992
2. Becht J.L. - malignant seminoma in a stallion. J.A.V.M.A. 1979, **175**(3), 292-293
3. Bird K., Rosenfield A.T. Taylor K.J.W. - Ultrasonography in testicular torsion. Radiology **147**, 527-534, 1983
4. Brass K.E.- Mattos R.C.- Gregory R.M. Rath D.- Merkt H.- Use of ultrasonics for the andrological examination of stallions. Revista Brasileira De Reproducao Animal **13** (3) 167-172, 1989
5. Caron J.P., Barber S.M., Bail J.V. Equine Testicular Neoplasia. Comp. Cont. Ed. Vet. Pract. 7s: 53-39, 1985
6. Feeney D.A.- Johnston G.R.- The Ovaries And Testes. In Textbook Of Veterinary Diagnostic Radiology. Ed. By Thrall, Philadelphia Usa, W.B. Saunders & Co., 1994
7. Galofaro V. Et Al. - Spontaneous seminoma in a mule. Eq. Vet J. **18**(3): 218-219, 1986.
8. Gelber H.B. Et Al. - Equine testicular interstitial tumors. Vet. Pathol., **24** (3), 231-234, 1987
9. Guarda F., Mandelli G. - Trattato Di Anatomia Patologica Veterinaria, 2° Ed. 1995, Utet, Torino.
10. Hunt J.- Hay W.- Colatos C.- Wellws E.- - Testicular seminoma associated with torsion of the spermatic cord in two cryptorchid stallions. J.A.V.M.A. **197**(11), 1484-1486, 1990.
11. Kenney R.M.- Hurtgen J.- Pierson R.- Witherspoon P.- Simon J.- In Manual For Clinical Evaluation Of The Stallion. Society For Theriogenology, Pp. 3-100. Hastings, Nebraska, Usa.
12. Jann H.W.-Rains J.R - Diagnostic ultrasonographic for evaluation of cryptorchidism in horses. J.A.V.M.A. **196**, 297-300, 1991
13. Jussiaux M., Trillaud C. La Reproduction Chez Le Cheval. 1- L'etalon. Collection Sciences Hippiques, Diffusion Maloine Sa, 1980
14. Love C.C.- Ultrasonographic evaluation of the testis, epididymis and spermatic cord of the stallion. Equine Practice **8**, 167-182, 1992
15. Mayr T., Love S., Schumacher J., Watson E. - Equine Medicine, Surgery And Reproduction. W.B. Saunders, Philadelphia, 1998.
16. Malmi R. - Correlation between lectin binding and clinical factors in seminoma patients. J.Cancer Res.Clin Oncol. **115**(1), 96-100, 1989
17. Mensa A. - Patologia Chirurgica Veterinaria. Ed. Utet, Torino, 1946
18. Morrow D.A. - In Current Therapy In Theriogenology : Diagnosis, Treatment And Prevention Of Reproductive Diseases In Animals. W.B. Saunders Co., 1980
19. Nielsen S.W., Lein D.H.- Tumours of the testis. Bull. W.H.O. **50**, 71-78, 1974
20. Nielsen S.W., Kennedy P.C. - In Moulton J.E., Tumors In Domestic Animals. 3rd Ed., 1990, University Of California Press.
21. Pandolfi F. Et Al. - Seminoma with multiple metastases in a zebra (equus zebra) x mare (equus caballus). Eq.Vet. J., Jan 1; **15**(1): 70-72, 1983.
22. Reifinger M. - Statistical investigation on the occurrence of testicular neoplasm in domestic animals. J.A.V.M.A. **35**, 63-72, 1988
23. Rifkin M.D., Kurtz A.B., Goldberg B.B. - Epididymis examination by ultrasound: correlation with pathology. Radiology **151**, 187-190, 1984
24. Sanna Passino E., Cherchi R., Careddu G.M., Muzzetto P. - L'examen échographique du testicule chez l'etalon. Pratique Veterinaire Equine **29**, N.3, 1997
25. Sanna Passino E., Cherchi R., Careddu G.M., Pirino S., Muzzetto P. Il seminoma nel cavallo. Caso clinico. V Congresso S.I.C.V., Ostuni 11-12/6/1998
26. Schoenbauer M., Et Al. - Seminome Beim Pferd Eine Retrospektivuntersuchung. Zbl. Vet. Med. A. **30**, 189-198, 1983
27. Sherman A. - Malignant seminoma in a horse. J. Of Eq. Vet. Science **10** (4), 272, 1990

28. Smith B.L. - Malignant seminoma in a cryptorchid stallion .J.A.V.M.A., **195**(6), 775-776,1989
29. Smyth G.B. - Testicular teratoma in an equine cryptorchid. Eq. Vet J. Jan 1; **11**(1): 21-23,1979.
30. Stock J.A.- Teratoma and cyst formation of the equine cryptorchid testicle. J.A.V.M.A. **170**: 150-152,1977.
31. Thompson D.L.- Pickett B.W.- Squires E.L.- Amann R.P. - testicular measurements and reproductive characteristics in stallions. J. Reprod. Fert. 1979, Suppl.27, 13-17
32. Traub-Darkatz J.C.- Trotter G.W.- Kaser-Hotz B.- Bennet P.G.- Kiper M.L.- Veeramachanemni D.N.R. - Ultrasonographic detection of chronic epididymitis in a stallion. J.A.V.M.A. **32** (6) 306-311, 1991
33. Trigo F.J. - Metastatic equine seminoma: report of two cases. Vet.Pathol. **21**(2), 259-260, 1984
34. Valentini S.- Della Salda L. - Analisi comparata tra referti ecografici ed istopatologici relativi ad un seminoma in un cavallo. Ippologia **5**, 1, 83-88,1994
35. Valenza F. - Classificazione e caratteristiche morfologiche dei tumori dell'apparato genitale maschile nei mammiferi domestici. In Quaderni Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche **40**, 273-282, 1994.
36. Varner V.D.- Schumacher J.- Blanchard T.L.- Johnston L. - Disease and management of breeding stallions. Edit. Am.Vet.Publications, Goleta Ca, 1991.
37. Vento V.R. Del - Amann R.P.-Trotter G.V.-Veer Amachaneni D.N.R.-Squires E.L. - Ultrasonographic and quantitative histologic assessment of sequelae to testicular biopsy in stallion. American Journal Of Veterinary Research **53** (11)2094-2101, 1992
38. Withrow S., Reeves N. - Tumours of the male reproductive tract. In Withrow S. and Mac Ewen E.G.: Small Animal Clinical Oncology, 2nd Ed. W.B. Saunders Co, Philadelphia 373-379, 1996
39. Youngquist R.S. - In Current Therapy in Large Animal Theriogenology. W.B. Saunders Co., 1997

INTOSSICAZIONE DA CARBAMMATI NEL CANE: OSSERVAZIONI IMMUNO-ISTOCHEMICHE E RILIEVI TOSSICOLOGICI

Perillo A., Luppi A.

Istituto di Anatomia Patologica Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bari.

INTRODUZIONE

Per pesticida, secondo il gruppo di lavoro della Federal Environment Pesticide Control dell'O.M.S. s'intende "una sostanza o una miscela di sostanze atte a prevenire, distruggere, allontanare o attenuare qualsiasi avversità (insetto, nematode, fungo, erbe nocive ed altre forme di piante terrestri ed acquatiche, sia di vita animale o di virus batteri o altri microrganismi al di fuori di quelli che colpiscono l'uomo o gli altri animali viventi) e qualsiasi sostanza o miscela di sostanze usate come influenzanti la vita delle piante, compresi i defoglianti e gli essiccanti".

In Italia al termine di pesticida di origine anglosassone viene preferito quello di fitofarmaco o, sebbene più limitativo, quello di antiparassitario. La loro immissione nell'ambiente rappresenta, quindi, una continua fonte di rischio polimorfa, quantitativamente ingente, che espone al pericolo di intossicazioni acute o croniche anche gravi l'uomo e molte specie animali, non solo quelle confinabili al mondo agricolo rurale, ma investendo pure gli animali dell'ambiente urbano, dove i casi di intossicazioni da insetticidi, non sono del tutto infrequenti da registrare. Lo studio delle intossicazioni da pesticidi, dolose o accidentali, negli animali d'affezione e in particolare nel cane costituisce pertanto un capitolo della patologia veterinaria importante, complesso e sempre attuale. In un simile rischio connesso all'uso dei pesticidi si inserisce la presente nota, intesa a descrivere due episodi di intossicazione acuta da noi osservati a distanza di circa un mese l'uno dall'altro, su due cani boxer, madre e figlia, appartenenti allo stesso proprietario e che vivevano in un ambiente rurale, intossicati da methomyl (S-metil N-meticarbomoil-ossi tioacetimidato) meglio conosciuto con il nome di Lannate (Lannate 25, Terlate), un carbammato eterociclico, appartenente alla V classe dei presidi sanitari, usato prevalentemente come insetticida.

Il methomyl risulta essere ugualmente tossico per inalazione, per contatto con le mucose, buccale, nasale, congiuntivale e con la cute (DL50 pari a 1000 mg/Kg se la cute presenta delle escoriazioni). Dopo ingestione viene rapidamente assorbito nel tratto digestivo e la sua emivita, come per gli altri carbammati, è piuttosto ridotta. Nelle 24 ore successive all'assunzione, l'80-90% della dose ingerita è eliminata attraverso le urine. Il processo di assorbimento attraverso l'apparato digerente può essere più o meno rapido a causa della possibile formazione di composti insolubili o di degradazione, l'insorgenza e l'intensità di vomito e diarrea è in relazione all'integrità funzionale del fegato, organo principalmente interessato alla sua metabolizzazione.

L'azione tossica del methomyl consiste in una inibizione dell'enzima acetilcolinesterasi responsabile della degradazione dell'acetilcolina, il neuromediatore del sistema nervoso parasimpatico. L'acetilcolina, non più distrutta, si accumula a livello delle sinapsi nervose, provocando una stimolazione esagerata dei recettori colinergici.

E' venuto alla nostra osservazione il caso di due cani di razza boxer di sesso femminile, con età di 3 e 1 anno (rispettivamente madre e figlia), deceduti a distanza di un mese l'una dall'altra. Il proprietario aveva richiesto che sui due animali venisse eseguito un'esame autoptico, avanzando l'ipotesi che i cani fossero stati oggetto di avvelenamento dal momento che circa 40 giorni prima gli era morto improvvisamente anche un altro soggetto di 6 mesi necroscopicamente refertato dal Veterinario curante come quadro di cardiomiopatia dilatativa idiopatica, pur avendo presentato anamnesticamente andatura vacillante, decupito apatico, disturbi respiratori, inappetenza e scialorrea. Dei due soggetti venuti alla nostra attenzione, la madre era stata trovata morta dal proprietario nella campagna circostante la propria abitazione, senza che questi potesse osservare alcun sintomo intra vitam nell'animale. La figlia, invece aveva manifestato, poco prima del decesso, una sintomatologia caratterizzata da tremori muscolari, dispnea, rigidità degli arti, scialorrea, inappetenza, miosi, pollachiuria e lacrimazione. I due animali si presentavano in buone condizioni generali di nutrizione e all'esame autoptico si metteva in evidenza il tatuaggio identificativo nel piatto interno della coscia destra senza rinvenire alcunché di anomalo all'esame esterno della cute. Estese macchie ipostatiche di color rosso vinoso si presentavano nelle regioni dei clivi. Sparse infiltrazioni emorragiche si evidenziavano a carico del sottocute, nelle regioni toraciche e addominali. Le mucose apparenti risultavano fortemente congeste. Nulla da rilevare alle parti molli che ricoprono il cranio che si presentava integro con la dura madre non aderente di aspetto e spessore normale: intensa la congestione meningo-encefalica.

Cervello, cervelletto, bulbo e ponte in sezione non rivelavano lesioni e si confermava la diffusa congestione. All'apertura della cavità toracica veniva repertato in entrambi i cadaveri la presenza di liquido siero-emorragico. Modesti versamenti nel cavo pericardico e in quelli pleurici. Il cuore aumentato di volume si presentava di aspetto globoso per sfiancamento del ventricolo destro con il miocardio piuttosto flaccido, congesto e con segni di miocardiosi. I polmoni espansi, di colorito rosso cianotico apparivano edematosi senza essere in preda a processi flogistici. Al taglio non si apprezzavano lesioni a focolaio, ma un'abbondante infiltrazione di liquido schiumoso, rossastro che diffondeva anche in bronchi e trachea. Tutti questi riscontri a livello di cuore e polmoni, risultavano più appariscenti nella cagna giovane rispetto al cadavere della madre. All'apertura della cavità addominale si rinveniva un limitato versamento siero-emorragico con sierosa peritoneale liscia, lucente e vasi mesenterici fortemente iniettati. Il fegato, congesto, aumentato di volume,

evidenziava in superficie minute aree giallastre sparse, di aspetto distrofico, particolarmente evidenti (0,5-1 cm di diametro) nell'animale giovane che venivano confermate anche alla sezione di taglio. La cistifellea appariva ripiena di bile fluida color giallo-verdastro. Fenomeni di congestione erano evidenti nei due animali a carico della milza discretamente megalica, che al taglio presentava la polpa rossa ben trattenuta, i follicoli malpighiani e la trabecolatura poco appariscente. Nulla di patologico, macroscopicamente visibile a carico del pancreas, tranne un'intensa congestione. Lo stomaco dilatato era pieno di materiale alimentare indigerito asciutto, rappresentato da penne, piume, zampe di volatili (verosimilmente tacchinotti) nella madre, mentre nello stomaco della figlia si rinveniva analogo contenuto, sempre ricco di piume ma abbastanza fluido. A livello intestinale, il tenue si presentava vuoto, mentre il grosso intestino evidenziava feci poltigliose bruno-verdastre senza rinvenire masse fecali formate. I reni apparivano congesti, di consistenza e volume normali, facilmente scapsulabili. Al taglio non si apprezzavano lesioni. Anche le surrenali risultavano congeste senza manifestare almeno macroscopicamente alcunché di patologico. La vescica non conteneva urina e non evidenziava fenomeni patologici. Da segnalare che nella carcassa della madre più manifesti apparivano i fenomeni autolitici a livello parenchimale, dal momento che l'esame necroscopico è stato effettuato circa 72 ore dopo la morte della cagna.

MATERIALE A METODI

Eseguite le necrosco pie si provvedeva ad effettuare prelievi di porzioni di organi (polmone, rene, fegato, milza, surrenale, pancreas, encefalo e midollo spinale) per effettuare indagini istopatologiche, seguendo le comuni tecniche di fissazione (formalina al 10%), di paraffinazione e di colorazione (PAS, ematossilina-eosina, Van Gieson, Luxol Fast blue) ed indagini immunoistochimiche solo su campioni di midollo spinale, previamente congelati in isopentano preraffreddato, utilizzando un anticorpo monoclonale specifico biotinilato anti-acetilcolintransferasi (anti-ChAT, clone 11-255 Boehringer Mannheim), visualizzato con il complesso ABC-perossidasi, seguendo la metodica ottimizzata dalla casa produttrice. Considerato il sospetto di intossicazione da fitofarmaci, ed in particolare da insetticidi organo fosforici o da carbammati si procedeva a prelevare in toto il materiale alimentare presente nello stomaco dei due soggetti, a raccogliarlo in due distinti sacchetti di plastica, per poi congelarlo a -18°.

RISULTATI

I quadri morfologici osservati istologicamente sui campioni di organi prelevati, ripetevano globalmente con assoluta costanza gli stessi aspetti in tutti e due i casi. A livello polmonare l'esame microscopico rivelava aspetti di edema polmonare associati a fenomeni congestizi, confermando il

quadro macroscopico. In ambito epatico le sezioni allestite mostravano quadri di congestione associati ad aree in preda a distrofia ipossica epatocitaria. La PAS dimostrava scarsa reattività, particolarmente accentuata nella zona periferica del lobulo. Il rene, oltre all'aspetto congestizio, mostrava sofferenza glomerulare e fenomeni di degenerazione vaculare ed idropica a carico dell'epitelio tubulare, interessando prevalentemente la parte prossimale dei tubuli contorti e meno intensamente quella dei tubuli retti. Nel surrene gli aspetti osservati, al di fuori di una discreta congestione vasale, non presentavano particolari scostamenti dalla norma nell'aspetto cromatico e morfostrutturale. Anche nelle sezioni istologiche della milza e del pancreas non si rivelano apprezzabili differenze morfologiche rispetto alla norma, se non il prevalere di una condizione congestizia generalizzata. A carico dell'encefalo del midollo spinale nulla di particolarmente anomalo da segnalare se non quadri di congestione vasale diffusa.

Per quanto attiene l'esame del midollo spinale delle due cagne intossicate, la reazione immunistochemica è porsa sempre molto tenue e comunque decisamente inferiore a quella ottenuta nei controlli, utilizzando in quest'ultimo caso sezioni di midollo di cani morti per altre cause non coinvolgenti il midollo spinale. In alcune sezioni, sempre dei soggetti in esame, la reattività è stata quasi del tutto negativa. L'esame tossicologico sugli omogenati acidificati ed estratti con cloroformio risultava positivo per la presenza di carbammati eterociclici ed in particolare del methomyl (S-metil N-metilcarbamoil-ossi tioacetimidato) in entrambi. Più specificamente veniva osservata la presenza massiva di methomyl nel campione prelevato dallo stomaco della madre ed in tracce in quello della figlia. Data la natura chimica del gruppo attivo, il dato qualitativo, anche a detta del responsabile del Laboratorio di Tossicologia dell'Istituto di Medicina Legale del nostro Ateneo che ha eseguito le analisi, può essere considerato sufficiente per la formulazione di una corretta diagnosi di avvelenamento da methomyl, trattandosi di un tossico particolarmente potente (V classe). Negativa è risultata la ricerca di composti organo fosforici nei campioni esaminati.

DISCUSSIONE

Nel contesto presente, sulla base delle valutazioni anamnestiche, sintomatologiche, necroscopiche, immuno-istochimiche, e tossicologiche si può con certezza diagnostica affermare che i due cani esaminati sono morti per intossicazione acuta da methomyl, un carbammato molto usato in agricoltura. Chiara ed evidente l'eziologia dell'avvelenamento riscontrato le cui modalità d'insorgenza sono da correlare al fatto che recentemente e a più riprese erano state poste in atto irrorazioni da methomyl nel frutteto confinante con il recinto in cui erano tenuti i cani. In tale terreno occasionalmente sono presenti anche alcuni tacchinotti sfuggiti alla sorveglianza del proprietario. Tali tacchinotti, si sono intossicati per esposizione diretta o verosimilmente per

ingestione del fitofarmaco, venendo ben presto a morte e risultando facile preda dei cani, voraci, che incidentalmente sono transitati nel frutteto. I cani dopo aver divorato i tacchini si sono a loro volta intossicati e sono deceduti.

A conclusione del nostro lavoro vogliamo sottolineare come i due casi di intossicazione acuta da methomyl descritti nei loro aspetti macro e microscopici e per le modalità con le quali si sono verificati assumono un certo interesse pratico per la scarsa documentazione in questo senso rilevata in letteratura ma soprattutto perché vuole richiamare l'attenzione e far riflettere sui rischi cui possono andare l'uomo e gli animali che vivono o transitano in vicinanza di terreni irrorati di recente con siffatti pesticidi.

BIBLIOGRAFIA

1. Delaunois A., Lessire F., Fanal H., Ansay M., Bloden S., Gustin P., Intoxications au temik chez les animaux domestiques et sauvages: un problème alarmant en Wallonie. *Ann. Med. Vet.*, **141**:353-360, 1997.
2. Quick M.P., *Pesticide poisoning of livestock: A review of cases investigated*. *The Veterinary record*, **111**:5-7, 1982.
3. Rosenstein L.S. and Brice M.A., The use of toxicity studies to predict long term chronic effect resulting from the carbamate pesticide carbaryl. *European Soc. Toxicol. 17^o Meeting Montpellier*, **17**:33-47, 1975.
4. Soffietti M.G., Nebbia C., Carbammati, in Beretta E., *Tossicologia Veterinaria*, Ed. Grasso, 230-236, 1984.

CARATTERIZZAZIONE DEL “PROFILO ISTOLESIVO” NEL MIDOLLO SPINALE DI OVINI CON SCRAPIE NATURALE

C. Ligios, E. Bozzetta*, D. Sardo, C. Casalone*, G. Di Guardo°, U. Agrimi °°, C. Arru, M. Caramelli.*

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna “G. Pegreffi”, Sassari.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d’Aosta, Centro di Referenza Nazionale per le Encefalopatie Animali, Torino.

° Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, Roma.

°° Istituto Superiore di Sanità – Laboratorio di Medicina Veterinaria, Roma.

INTRODUZIONE

La scrapie è una malattia della pecora, della capra e del muflone compresa nel gruppo delle Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili (EST).

Il quadro istopatologico, strettamente confinato al sistema nervoso centrale (SNC), è caratterizzato dalla formazione di vacuoli nel pericario neuronale e nel neuropilo, nonché da astrocitosi ed astrogliosi. Nella scrapie ovina naturale l’entità della vacuolizzazione (spongiosi) e la relativa distribuzione in specifiche aree dell’encefalo presentano, in molti casi, delle differenze legate alla razza (1) e all’età dei soggetti malati (2). In topi “inbred” sperimentalmente infettati con l’agente della scrapie, l’intensità e distribuzione della spongiosi espressa sotto forma di “profilo istolesivo” hanno già consentito di ipotizzare l’esistenza di diversi ceppi di agente della scrapie (3, 4) nonché di differenziare fenotipicamente le varie EST (5).

Nonostante le notevoli difficoltà interpretative esistenti in materia, alcuni Autori ritengono che dallo studio dei profili istolesivi si possono ottenere indicazioni utili anche per la conoscenza della patogenesi di questa malattia (2, 5).

Solo raramente, nell’ambito della caratterizzazione dei profili istolesivi in casi di scrapie naturale, è stato dettagliatamente valutato il midollo spinale nonostante si ritenga che quest’organo abbia una notevole importanza nella patogenesi della malattia. Infatti, esperimenti nel topo hanno dimostrato che una delle vie percorse dall’agente della scrapie, per raggiungere il cervello, è rappresentata dal midollo spinale (6, 7). In considerazione di ciò riteniamo utile lo studio “quantitativo” e della topografia delle lesioni spongiformi nel midollo spinale di ovini con scrapie.

MATERIALE E METODI

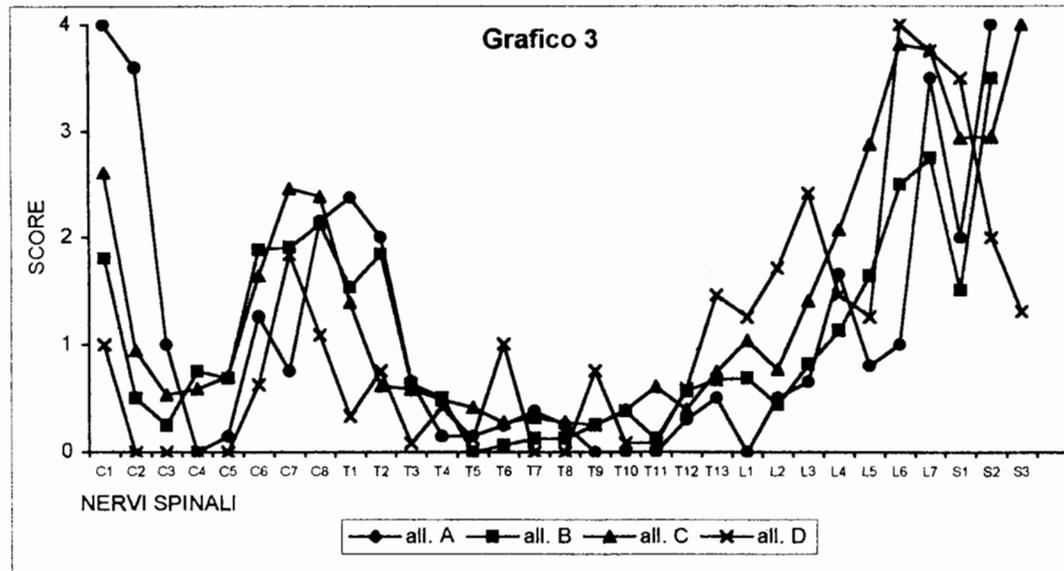
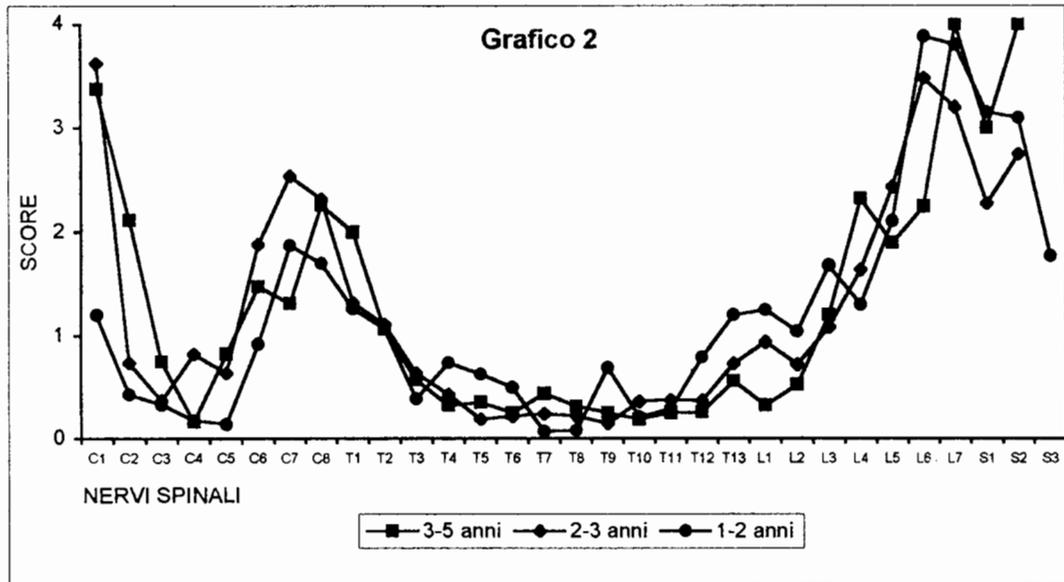
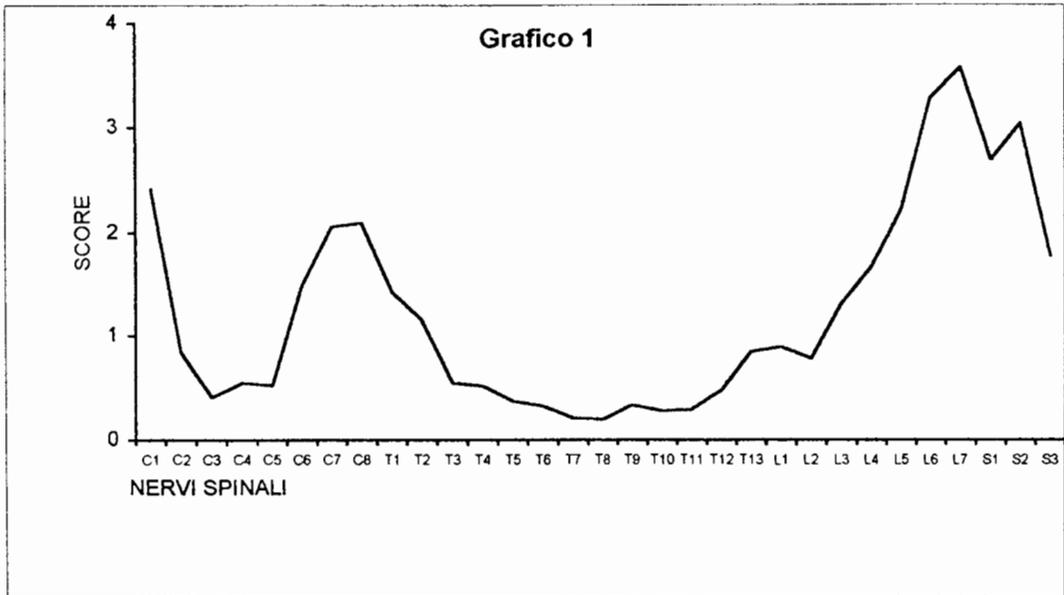
Oggetto delle nostre indagini sono stati 20 ovini di razza Sarda provenienti in numero diverso da 4 allevamenti della Sardegna. Tutti i soggetti presentavano sintomi clinici riferibili a scrapie (8). I 20 ovini, che avevano un’età media di 37 mesi, sono stati stratificati in 3 classi di età: da 1 a 2, da 2 a 3 e da 3 a 5 anni. Come soggetti controllo sono stati utilizzati 4 ovini regolarmente macellati provenienti da allevamenti ritenuti indenni da scrapie. Da tutti i soggetti, sacrificati ad uno stadio clinico conclamato, sono stati prelevati il midollo allungato ed il midollo spinale compreso tra C1 e

S3. Entrambi i distretti tessutali venivano fissati in formalina tamponata al 10% per 20 giorni. Dal midollo allungato sono state effettuate sezioni coronali che, incluse in paraffina e tagliate a 5 μ , sono state poi colorate con E-E e, per l'evidenziazione della PrPsc, con una metodica immunostochimica (9) che utilizzava un anticorpo policlonale. Dal midollo spinale sono state eseguite delle sezioni coronali a livello della radice dei nervi spinali dal 1° cervicale sino al 3° sacrale, ottenendo un numero totale di 31 aree da esaminare. Da ciascuna di queste, 6 sezioni seriali dello spessore di 7 μ sono state colorate con E-E ed esaminate al microscopio ottico con obiettivo 10 X. La gravità della spongiosi è stata valutata in tutta la sostanza grigia impiegando un sistema di punteggio utilizzato da altri Autori (10). Per tutte le aree è stato ottenuto un valore che esprimeva la media dei punteggi attribuiti alle 6 sezioni esaminate. In alcuni soggetti non è stato possibile avere a disposizione tutte le aree perché danneggiate durante il prelievo.

RISULTATI

Nel midollo allungato di tutti i soggetti che presentavano sintomi riferibili a scrapie sono state osservate le tipiche lesioni spongiformi e gli esami immunostochimici hanno evidenziato depositi di PrPsc. Esame istologico ed immunostochimico sono risultati negativi per scrapie in tutti i controlli. Nel midollo spinale la spongiosi del neuropilo appariva fondamentalmente, se non totalmente, distribuita a livello della sostanza gelatinosa del Rolando. Rarissimi erano i vacuoli osservati nel neuropilo sia alla base delle corna dorsali, sia a livello delle corna ventrali. Anche la vacuolizzazione dei grossi motoneuroni delle corna ventrali costituiva un aspetto lesivo assai raro. Da notare che nel midollo spinale di 2 ovini una lieve spongiosi era presente a livello dei segmenti C7-C8 e L6-L7 mentre era praticamente assente in tutte le restanti sezioni.

Nel grafico 1 è rappresentato il profilo istolesivo ottenuto dalla media dei punteggi rilevati in tutti i 20 casi esaminati. Nel grafico 2 e 3 sono riportati rispettivamente i profili istolesivi ottenuti in base alle classi di età e ai 4 allevamenti di provenienza.



DISCUSSIONE

Le principali caratteristiche del profilo istolesivo del midollo spinale, nei soggetti considerati si possono così riassumere: 1) a livello della fuoriuscita del nervo spinale C1 e nei 2 tratti compresi tra C7-C8 e L6-L7 l'intensità della spongiosi è assai più marcata; 2) essa è localizzata principalmente nelle corna dorsali; 3) l'entità della spongiosi presenta variazioni individuali, mentre la maggiore gravità delle lesioni nelle intumescenze cervico-toracica e lombo-sacrale è costante; 4) non si è riscontrata una differenza degna di nota tra le medie dei profili istolesivi ottenuti per allevamento e classe di età. Questi risultati sembrano concordare solo in parte con quelli ottenuti su ovini inglesi nel 1960 da Wight (11), il quale, sebbene avesse osservato anch'egli una maggiore spongiosi a livello delle intumescenze cervicali e lombari, descriveva principalmente la vacuolizzazione neuronale. Nello stesso lavoro non vengono riferite lesioni nella sostanza gelatinosa del Rolando. Appare interessante notare, piuttosto come i nostri dati presentino corrispondenza con quelli rilevati nella Encefalopatia Spongiforme Bovina (5).

Studi sulla diffusione spazio-temporale dell'agente della scrapie nel SNC di hamsters, infettati sperimentalmente *per os*, hanno dimostrato che il più precoce sito di accumulo di PrPsc è costituito dal segmento T4-T9 del midollo spinale. Inoltre la quantità di PrPsc sembrerebbe correlata con l'infettività e sarebbe maggiore nello stesso segmento di midollo spinale ove è più precoce la sua comparsa post-infezione (7). Considerato che lo sviluppo delle lesioni spongiformi appare correlato sia con l'infettività (6) sia con la presenza del PrPsc (5) si potrebbe ipotizzare che le intumescenze cervico-toraciche e lombo-sacrali, in relazione alla maggiore gravità delle lesioni ivi osservate, rappresentino il sito d'ingresso e di prima localizzazione dell'agente della scrapie nel SNC di ovini. Ulteriori studi volti a definire sia l'immunolocalizzazione che l'entità di accumulo della PrPsc nel midollo spinale, in casi naturali di scrapie ovina, sono comunque necessari per avvalorare la suddetta ipotesi.

Si ringrazia per la collaborazione il Coadiutore Tecnico Signor Alfio Lai.

BIBLIOGRAFIA

1. Zlotnik I: Report of Scrapie Se, ARS, 91-53. Washington DC, US Dept of Agriculture, p. 213, 1964.
2. Wood JLN, McGill IS, Done SH, Bradley R: Neuropathology of scrapie: a study of distribution patterns of brain lesions in 222 cases of natural scrapie in sheep, 1982-1991. *Vet Rec*, 140, 167-174, 1997.
3. Fraser H and Dickinson AG: Scrapie in mice: agent-strain differences in the distribution and intensity of grey matter vacuolation. *J Comp Path*, 83, 29-40, 1973.
4. Bruce M, Fraser H: Scrapie strain variation and its implications. In: *Transmissible spongiform encephalopathies*. Chesebro B. W. Ed. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 172, 125-138, 1991.

5. Wells GAH, Hawkins SAC, Cunninham AA, Blamire IWH, Wilesmith JW, Sayers AR and Harris P: Comparative pathology of the new transmissible spongiform encephalopathies. In: Bradley R and Marchant B (Eds) *Transmissible Spongiform Encephalopathies*. Proceedings of a Consultation on BSE with the Scientific Veterinary Committee of the Commission of the European Communities, Brussels, 14-15 September 1993; Dordrecht: Kluwer Academics, p.p. 327-346.
6. Kimberlin RH, Walker CA: Pathogenesis of mouse scrapie: patterns of agent replication in different parts of CNS following intraperitoneal infection. *J R Soc Med*, 75, 618-624, 1982.
7. Beekes M, Baldauf E, Diringner H: Sequential appearance and accumulation of pathognomonic markers in central nervous system of hamsters orally infected with scrapie. *J Gen Virol* 77, 1925-1934, 1996.
8. Ligios C, Bandino E, Di Guardo G, Ferrari GC, Perfetti MG, Eleni C, Ru G, Muceli G, Spanu GP, Agrimi U, Pocchiari M: Scrapie della pecora: osservazioni cliniche ed epidemiologiche in pecore di razza sarda. *Ob&Do Vet*, 20 (1), 65-70, 1999.
9. Haritani M, Spencer YI, Wells GAH: Hydrated autoclave pretreatment enhancement of prion protein immunoreactivity in formalin-fixed bovine spongiform encephalopathy-affected brain. *Acta Neuropathol (Berl.)*, 87, 86-90, 1994.
10. Simmons MM, Harris P, Jeffrey M, Meek SC, Blamire IWH, Wells GAH: BSE in Great Britain: consistency of the neurohistopathological findings in two random annual samples of clinically suspect cases. *Vet Rec*, 138, 175-177, 1996.
11. Wight PAL: The histopathology of the spinal cord in scrapie disease of sheep. *J Comp Path*, 70, 70-83, 1960.