

ATTI DEL II CONGRESSO NAZIONALE

A.I.P.Vet.

LODI 20-21 MAGGIO 2005



con la partecipazione di:

*Gruppo di Patologia Clinica Veterinaria
Gruppo Veterinario di Analisi di Immagine
Società Italiana di Patologia Tossicologica e Sperimentale*

e con

IL PATROCINIO DELLA FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA DI MILANO

ISSN 1825-2265

PRESENTAZIONE PLENARIA

LE BASI STATISTICHE PER UNA CORRETTA PROGETTAZIONE ED INTERPRETAZIONE DI UNO STUDIO DI PATOLOGIA.

Ru Giuseppe

Centro di Referenza sulle Encefalopatie Animali. Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta.

Non esiste una scuola per diventare ricercatori. Spesso la buona competenza metodologica viene raggiunta attraverso un percorso da autodidatta: studiando statistica ed informatica, inventandosi situazioni di ricerca in cui provare metodi e tecniche e cercando di collaborare o anche solo di osservare ricercatori più esperti.

Dalla statistica il ricercatore può trarre strumenti utili per orientare il proprio lavoro. Un problema può essere affrontato adottando uno tra i vari disegni di studio consolidati che rappresentano strategie alternative per dare risposta alle domande, frutto della curiosità scientifica. I principali disegni verranno quindi brevemente presentati.

Anche se la molteplicità delle tecniche statistiche a disposizione rende spesso difficile la scelta del metodo corretto da applicare, l'idea chiave alla base di tutti i metodi utilizzabili consiste nella possibilità di usare campioni della popolazione per poter trarre conclusioni con validità generale. Ciò è possibile conoscendo i due approcci alla base dell'inferenza statistica: il confronto tra la stima dei parametri di popolazione ed il test d'ipotesi. Essi costituiranno la seconda parte della relazione. Infine è indispensabile essere consapevoli degli errori in cui si può incorrere nell'interpretazione dei risultati ottenuti: l'effetto o la differenza realmente presente può sfuggirci sotto il naso, oppure l'illusione della scoperta annebbiarci la mente. In questo caso è utile conoscere la logica generale che sottende alla scelta di una numerosità campionaria adeguata.

Parole chiave: Disegno di studio, inferenza statistica, intervalli di confidenza, valore P, dimensione campionaria.

STATISTICAL FOUNDATIONS FOR DESIGN AND INTERPRETATION OF RESEARCH IN PATHOLOGY.

In our country during undergraduate courses there are few opportunities to learn how to carry out scientific research. The young researcher can gain some knowledge from his senior colleagues and he will have to study on his own the basics of biostatistics to be applied in his research activity. This presentation will focus on some fundamentals. Firstly the main categories of study design will be shown. After that rather than to pay much attention on the dozens of different available methods of analysis, the philosophy that underlies all methods will be described. The aim of scientific research should be to extrapolate the findings from a sample to the general population. Therefore both estimation and hypothesis testing will be shown using examples from real life. Finally the two basic type of statistical error will serve to discuss the general problems in results interpretation.

Key words: Study design, statistical inference, confidence intervals, P value, sample size.

PRESENTAZIONE PLENARIA

LE PROTEINE DI FASE ACUTA QUALE STRUMENTO DI MONITORAGGIO SANITARIO NEI GROSSI ANIMALI IN ALLEVAMENTO E ALLA MACELLAZIONE

Paltrinieri Saverio

Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Università di Milano.

La conseguenza sistemica di processi infiammatori localizzati è rappresentata da una complessa serie di eventi che esitano nell'aumento della concentrazione di alcune proteine plasmatiche note come proteine di fase acuta (o, secondo l'acronimo anglosassone, APP), che possono essere quindi usate per evidenziare processi infiammatori pre-sintomatici o latenti. Per questo motivo è stato proposto il loro utilizzo per la gestione degli animali in produzione, sia monitorando *in vivo* le varie fasi di accrescimento o lattazione, sia ricercando patologie subcliniche in fase di macellazione.

Nel bovino vengono utilizzate le concentrazioni ematiche di aptoglobina (Hp) e siero amiloide A (SAA), le quali, oltre ad aumentare aspecificamente in corso di patologie batteriche, si sono dimostrate inversamente correlate alla resa produttiva nonché utili ad identificare mastiti acute o croniche: quest'ultimo scopo può essere raggiunto anche misurando le due APP direttamente nel latte, dove la concentrazione di SAA risulta più sensibile della conta delle cellule somatiche.

Le performances produttive del suino, invece, vengono monitorate misurando la Hp o la cosiddetta Pig Major Acute Phase Protein (Pig-MAP). Anche queste APP aumentano in corso di diverse patologie, ma anche in presenza di stressors ambientali, scarsa igiene o trattamenti profilattici con antibiotici. Ne deriva che il monitoraggio delle APP in allevamento può consentire di sospettare uno dei problemi di cui sopra e, una volta identificato quale, di migliorare il management globale, e dall'altro che il rilievo di APP elevate in sede di macellazione può portare alla luce problemi sanitari latenti o nascosti. A questo proposito sono anche stati messi a punto metodi di indagine delle APP in sangue raccolto in sede di macellazione o addirittura nel "succo di carne", permettendo così il loro utilizzo anche direttamente in sede ispettiva.

Parole chiave: proteine di fase acuta, aptoglobina, SAA, Pig MAP, produzioni animali.

ACUTE PHASE PROTEIN AS A TOOL FOR MONITORING LARGE ANIMAL HEALTH STATUS DURING PRODUCTION AND AT THE ABATTOIR.

The systemic consequence of a local inflammatory response is a series of modifications that lead to an increased concentration of some plasma proteins called acute phase proteins (APP), which can thus be used to detect pre-symptomatic or latent inflammations. For this reason it has been proposed to use APP measurement for the management of productions by monitoring *in vivo* growing or lactating animals or by investigating the presence of subclinical diseases at the abattoir.

Serum concentration of Haptoglobin (Hp) and Serum Amyloid A (SAA) are used in bovine: these APP increase during bacterial diseases, but they are also negatively correlated with milk production and can be used to detect acute or chronic mastitis. To this aim, APPs can also be measured in milk, where SAA concentration are more sensitive than somatic cell count.

Productive performances of swine can be monitored by measuring Hp or the so-called Pig Acute Phase Protein (Pig.MAP). Also these proteins increase during several diseases but also in the case of environmental stressors, poor breeding hygiene and antibiotic administration. As a consequence, APP can be used to ameliorate the overall management but also to identify latent or hidden sanitary problems at the abattoir: to this aim, methods to investigate APP concentration in blood collected at slaughtering or in meat juice collected during meat inspection have been established.

Key words: acute phase proteins, haptoglobin, SAA, PigMAP, animal production.

Cosa sono le proteine di fase acuta: con il termine proteine di fase acuta (o, secondo l'acronimo anglosassone, APP) vengono indicate quelle proteine la cui concentrazione ematica in corso di processo infiammatorio varia di almeno il 25% rispetto al livello basale. Tale variazione dipende essenzialmente dalle citochine prodotte nel sito di flogosi. In

questa sede, infatti, le cellule infiammatorie accorse in risposta allo stimolo flogistico producono una serie di peptidi proinfiammatori. La gran parte di questi peptidi modula la risposta infiammatoria locale, ma alcuni di essi, ed in particolare l'interleukina-1 (IL-1), il tumor necrosis factor- α (TNF α), e, in minor misura, l'interleukina-6 (IL-6) sono in grado di indurre una risposta sistemica nota come "reazione della fase acuta", caratterizzata da una serie di alterazioni aspecifiche quali anoressia, dimagrimento, ottundimento del sensorio, ma soprattutto febbre, leucocitosi neutrofila e variazione delle proteine di fase acuta. Febbre e leucocitosi sono indotte dalle citochine di cui sopra solo indirettamente, in quanto le citochine inducono la liberazione di altre molecole direttamente responsabili dei fenomeni sopra citati; le alterazioni della sintesi proteica dipendono invece direttamente da IL-1, TNF α e IL-6, le quali attraverso il circolo ematico raggiungono le cellule bersaglio, dove attivano la liberazione di mediatori intracellulari in grado di modificare i rapporti tra anabolismo e catabolismo proteico. In particolare il TNF- α induce proteolisi a livello muscolare, consentendo così l'arrivo di aminoacidi al fegato, dove l'IL-1 modula la sintesi proteica diminuendo la produzione di alcune proteine, la cui concentrazione ematica quindi cala (APP negative) e stimolando la sintesi di altre, la cui concentrazione ematica quindi aumenta (APP positive). L'IL-6 gioca invece un ruolo importante nella liberazione delle APP positive dall'epatocita al sangue.

Differenze di specie nella produzione di APP: le APP negative, sono rappresentate in tutte le specie dall'albumina e da proteine di trasporto di ormoni e vitamine quali Retinol Binding Protein (RBP), Cortisol Binding Protein (CBP) o Transtiretina (TTR). Le APP positive sono numerosissime e, sebbene le loro funzioni, peraltro non del tutto conosciute, siano spesso molteplici, in linea generale le APP possono essere suddivise in proteine ad azione antibatterica e/o immunomodulatrice quali Proteina C Reattiva (CRP), frazioni del complemento (C3 e C4), α_1 -glicoproteina acida (AGP) o LPS Binding Protein (LBP); proteine di trasporto quali Aptoglobina (Hp) o ceruloplasmina (Cp); proteine in grado di proteggere i tessuti da eventuali danni generati durante la flogosi, quali Siero Amiloide A (SAA) o le α -globuline antiproteasiche (es: α_1 -antitripsina). Alcune di queste proteine (es: C3, C4, Cp) aumentano poco nel sangue (circa il 50% rispetto ai livelli basali), altre (AGP, Hp, LBP) aumentano 2-3 volte il livello basale, altre ancora (CRP, SAA) aumentano fino a mille volte il livello basale. La produzione di APP positive, però, tende ad essere specie-specifica: in alcune specie aumentano certe APP (APP maggiori per la specie in oggetto) e non altre (APP minori). Per quanto riguarda le specie di interesse zootecnico, oggetto di questa presentazione, le APP maggiori sono rappresentate da Hp e SAA per il bovino e da Hp e da una proteina specie-specifica nota come Pig Major Acute Phase Protein (Pig-MAP) per il suino.

Perché le APP possono essere usate negli animali in produzione: le APP negative vengono più o meno correttamente scarsamente considerate nella diagnostica in quanto poco specifiche o perché estremamente costose o difficili da misurare. Nella pratica diagnostica sono invece molto utilizzate le APP positive. Numerosi lavori hanno validato il ruolo diagnostico e prognostico delle APP positive maggiori dell'uomo e di animali da affezione, con l'intento di ottenere diagnosi precoci e quindi di impostare protocolli terapeutici altrettanto precoci. L'utilizzo delle APP positive negli animali da reddito è invece principalmente teso a migliorare il management aziendale o tutelare la salute pubblica. La filosofia alla base di questo tipo di utilizzo è la seguente: dato che le APP aumentano precocemente in corso di flogosi, posso utilizzare tali proteine per evidenziare processi infiammatori pre-sintomatici o latenti, il che permette di razionalizzare ed ottimizzare l'uso di farmaci, e quindi di residui nelle produzioni; di spegnere sul nascere focolai infiammatori che, se protratti, metterebbero a rischio le produzioni; di non sottrarre proteina alle produzioni (gli aminoacidi usati per produrre APP non possono essere utilizzati per la sintesi di proteine del latte o del muscolo); di rilevare, in sede di macellazione, quando non sono più disponibili altri parametri clinico-patologici utilizzabili *in vivo*, patologie subcliniche non caratterizzate da lesioni d'organo evidenti. Oltre a ciò, è stato dimostrato che la concentrazione ematica di alcune APP varia anche in corso di stress, di squilibri alimentari, o di pratiche gestionali inadeguate. Anche in questo caso, il monitoraggio dei livelli di APP può permettere di correggere il management e modificare le produzioni. Gli interessanti risultati forniti dai primi studi sul possibile ruolo delle APP nella gestione aziendale è stato tale che, nell'ambito del 5° programma quadro, l'Unione Europea ha finanziato una "Concerted Action" (QLK5-CT-1999-0153) tesa a promuovere gli studi in tal senso.

Utilizzo delle APP nell'allevamento bovino: Come precedentemente accennato, le APP più usate nella specie bovina per evidenziare stati infiammatori precoci o latenti sono la SAA e la Hp. Nonostante siano segnalate alterazioni nella concentrazione ematica di tali proteine in presenza di stressors tipici dell'allevamento intensivo, nonché fluttuazioni correlate a fase produttiva e a tipo di management aziendale, il fatto che sia Hp che SAA in corso di protocolli sperimentali rispondano in maniera evidente alla somministrazione di lipopolisaccaridi (LPS) batterici rende queste proteine i candidati ideali per valutare clinicamente la presenza di patologie di origine batterica. Da un punto di vista pratico ne è infatti stato suggerito l'uso nel monitoraggio di forme respiratorie da germi opportunisti o in corso di

pasteurellosi. Ciò nonostante aumenti di tali APP si sono registrati anche in corso di Theileriosi o in presenza di forme virali quali quelle da virus sinciziali o da BVD. Parte della loro importanza nella gestione delle produzioni bovine deriva quindi dalla loro capacità di evidenziare precocemente le patologie sopra citate, assumendo che la presenza di patologie in fase subclinica condiziona negativamente le produzioni. Da un punto di vista più strettamente produttivo, però, i livelli di Hp e SAA nel siero si sono dimostrati inversamente correlati all'entità ed alla qualità della produzione latte indipendentemente dalla presenza di patologie specifiche a ad infezioni mammarie clinicamente poco sintomatiche. A questo proposito, numerosi studi hanno evidenziato il ruolo delle APP nella protezione locale della mammella, tanto che, la ghiandola mammaria stessa è in grado di produrre sia Hp, che SAA: la concentrazione di entrambe le APP nel latte è quindi particolarmente elevata. Inoltre la presenza di una produzione locale di APP può permettere di identificare il singolo quarto interessato. In corso di mastiti, sia acute che croniche, quindi, le APP aumentano non solo nel siero ma anche nel latte, dove possono essere misurate facilmente. Il dosaggio della SAA nel latte risulta essere un metodo di identificazione di mastite più precoce e sensibile degli altri metodi utilizzati di routine, incluso la conta delle cellule somatiche.

Utilizzo delle APP nella catena produttiva dell'allevamento suino

Nel suino, la Hp o la Pig-MAP aumentano nel siero non solo come conseguenza di patologie batteriche di varia natura (*Streptococcus suis*, *actinobacillus pleuropneumoniae*) ma anche in corso di forme virali come la peste suina africana, infezioni da PMWS, micoplasmosi, e sono quindi utilizzate per monitorare lo stato sanitario generale dell'allevamento in particolare in rapporto alla presenza di patologie respiratorie multifattoriali. Accanto a stimoli decisamente patologici come quelli appena citati, anche problemi di management aziendale (stress da sovraffollamento o da trasporto, elevata o incontrollata carica microbica ambientale, tipo di alimentazione, somministrazione di antibiotici) possono indurre alterazioni di tali proteine. Da un punto di vista produttivo, come detto più sopra, ciò rappresenta, in ultima analisi, un danno economico anche in assenza di patologie specifiche e va corretto prima di incorrere in cali produttivi. L'elevata specificità delle APP come indicatori di infezione, inoltre, può permettere di evidenziare problemi sanitari latenti o nascosti anche in sede di macellazione, utilizzando metodi di indagine eseguibili su sangue raccolto al macello o addirittura sul "succo di carne", le cui concentrazioni di APP sono direttamente correlate con quelle ematiche. La disponibilità di tali metodi permette quindi anche indagini "retrospettive", effettuabili anche in sede ispettiva, ottimizzando i costi ed i tempi dell'analisi delle carcasse.

BIBLIOGRAFIA:

Le informazioni relative alla parte generale sono tratte dal testo Slauson D.O., Cooper B.J.: *Mechanisms of disease, a textbook of comparative general pathology*, 3rd ed., Mosby, 2001, mentre quelle relative all'utilizzo delle APP in suino e bovino rappresentano un sunto dei lavori presentati nell'ambito della Concerted Actions finanziata dalla Unione Europea, reperibili nei siti: <http://www.gla.ac.uk/faculties/vet/research/protein/>
<http://www.appcolloquium5.com>

PRESENTAZIONE PLENARIA

LE SINDROMI PARANEOPLASTICHE NEL CANE E NEL GATTO

Walter Bertazzolo

Pronto Soccorso Veterinario, via Defendente, 29/a - 26900 Lodi

Le sindromi paraneoplastiche (SP) sono manifestazioni cliniche e patologiche indotte da una neoplasia in maniera indiretta. Per definirsi tali, esse non devono essere imputabili alla diffusione locale o metastatica del tumore, e nemmeno alla elaborazione di sostanze attivamente prodotte in condizioni normali dal tessuto di origine della neoplasia. Sebbene l'eziopatogenesi di tali disordini sia poco spesso poco definita, nella maggior parte dei casi essa è da ricondursi alla produzione ectopica di molecole attive (es. ormoni, citochine, enzimi, proteine fetali, ecc.) da parte della cellule neoplastiche, o all'insorgenza di una risposta immunitaria aberrante che avrebbe come target i tessuti neoplastici ma colpisce infine anche tessuti non neoplastici. Le SP solitamente tendono a regredire con il trattamento della neoplasia responsabile: questa caratteristica può essere sfruttata per monitorare l'andamento di una terapia antineoplastica. Inoltre le SP sono spesso causa di morbidità e mortalità e richiedono pertanto specifici trattamenti, indipendenti dalle terapia antineoplastiche stesse. Potendosi presentare clinicamente prima della neoplasia responsabile, possono inoltre essere sfruttate per diagnosticarne la presenza.

Le SP interessano un ampio spettro di manifestazioni cliniche e possono essere classificate in sindromi endocrine (es.: ipercalcemia, ipoglicemia, sindrome da inappropriato rilascio di ormone antidiuretico), cutanee (es.: pemfigo paraneoplastico, eritema multiforme, dermatite necrolitica superficiale), neurologiche (es.: neuropatie centrali, periferiche, della giunzione neuromuscolare, miopatie), ematologiche (es.: neutrofilia/eosinofilia, trombocitosi, anemia, coagulazione intravascolare disseminata), e miscelanee (es.: febbre, cachessia, sindrome nefrosica/nefropatie, disordini gastroenterici, osteopatia ipertrofica).

Le SP vengono sempre più spesso descritte nella medicina del cane e del gatto. La loro conoscenza è essenziale al fine di compiere un corretto iter diagnostico e terapeutico in oncologia.

Parole chiave: cane, gatto, sindromi paraneoplastiche, oncologia.

PARANEOPLASTIC SYNDROMES IN THE DOG AND THE CAT.

Paraneoplastic syndromes (PS) are clinical and pathologic disorders due to neoplasia. By definition, PS cannot be directly explained by the local or metastatic spreading of the neoplasia, neither by the secretion of molecules normally produced by the tissue of origin. Although the exact mechanisms are usually unknown, PS are usually caused by the production of active substances (hormones, enzymes, cytokines, fetal proteins) by the neoplastic cells, or by an aberrant immune response targeting normal tissues. PS may regress after anti-neoplastic therapy. PS could be responsible for high morbidity and mortality and could be recognised before the neoplasia itself.

PS involve a large spectrum of disorders and may be classified as endocrine, cutaneous, neurologic, hematologic, and miscellaneous syndromes. Nowadays, the knowledge of PS is essential for the correct diagnosis and treatment of neoplastic diseases in dogs and cats as well as in human beings.

Key words: dog, cat, paraneoplastic syndromes, oncology.

PRESENTAZIONE PLENARIA

SIGNIFICATO DELLA VALUTAZIONE DEI MARCATORI CIRCOLANTI IN ONCOLOGIA UMANA.

Seregni Ettore

S.C. Medicina Nucleare

Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura dei Tumori, Milano

I biomarcatori tumorali sono quelle sostanze la cui presenza è dimostrabile nei fluidi biologici e può fornire indicazioni sulla presenza e sullo sviluppo di una neoplasia. Come per altri metodi diagnostici, anche la valutazione dei markers tumorali non sempre può fornire informazioni inequivocabili sulla presenza o assenza di una neoplasia, potendo risentire di errori che determinano risultati falsamente negativi o positivi. Per l'oncologo clinico è importante conoscere l'entità di tali errori e le cause che li determinano allo scopo di utilizzare nel modo migliore le potenzialità diagnostiche offerte dal dosaggio di queste sostanze. Non è proponibile l'utilizzo dei marcatori circolanti nello screening diagnostico di pazienti asintomatici o di pazienti a rischio di neoplasia, perché la specificità e sensibilità diagnostica dei marcatori non garantiscono accettabili valori di predittività con un dosaggio applicato su una popolazione a bassa prevalenza di malattia. L'impiego più razionale e proficuo dei marcatori tumorali consiste nell'interpretare le loro modificazioni nel tempo mediante il confronto di dosaggi seriati. La determinazione dei marcatori tumorali all'atto della diagnosi di neoplasia e prima di qualsiasi intervento terapeutico può costituire un aiuto nella stadiazione del tumore e, in alcuni casi, può avere significato prognostico.

Parole chiave: biomarkers tumorali, monitoraggio clinico, prognosi

SIGNIFICANCE OF THE CIRCULATING MARKERS IN HUMAN ONCOLOGY.

The definition of tumour biomarkers identifies those substances detectable in biologic fluids that may indicate the presence and progression of a tumour. Similarly to other diagnostic methods, the evaluation of tumour biomarkers may not always provide unequivocal informations regarding the presence or absence of a tumour, because of possible errors leading to false negative or false positive results. For the clinical oncologist it is important to be aware of these errors and of their causes in order to exploit the diagnostic potential of the quantification of these markers. It is not feasible to use the tumour biomarkers in a diagnostic screening of asymptomatic patients or patients at risk of developing neoplasia, because their diagnostic specificity and sensitivity are insufficient to assure an acceptable predictability when applied on a population with low prevalence of disease. The most rational and useful application of tumour biomarkers is the interpretation of their time-related modifications by means of the comparison of serial assays. The evaluation of tumour biomarkers at the time of diagnosis and before therapeutic intervention may help in staging the tumour and in some cases may have prognostic significance.

Key words: tumour biomarkers, clinical monitoring, prognosis

Si definiscono biomarcatori tumorali circolanti tutte quelle sostanze che, dimostrabili nei fluidi biologici, costituiscono un segnale della presenza e dello sviluppo di una neoplasia. Nella pratica clinica i marcatori vengono valutati nel sangue (siero o, più raramente, plasma), mentre il dosaggio di tali sostanze in altri fluidi biologici (liquido pleurico, peritoneale, liquido cefalo-rachidiano, ecc.) è limitato a situazioni particolari o a studi di ricerca. Come per tutti i metodi diagnostici utilizzabili in ambito oncologico, anche la valutazione dei marcatori tumorali non sempre fornisce un'informazione inequivocabile sulla presenza o assenza di una neoplasia, ma può, con diversa frequenza, essere associata ad errori che si traducono in risultati falsamente negativi o positivi. Ciò che assume importanza per l'oncologo è conoscere l'entità di tali errori e, soprattutto, avere presente le principali cause che vengono a determinarli nelle diverse situazioni cliniche allo scopo di utilizzare nel modo migliore le potenzialità diagnostiche offerte dal dosaggio di queste sostanze. Le potenzialità diagnostiche non sono trascurabili, soprattutto se si considerano le caratteristiche salienti delle informazioni fornite dalla valutazione dei marcatori: dati quantitativi ottenibili in tempi rapidi, in modo agevole, a limitato costo e senza particolari disagi per il paziente.

Associazione Italiana di Patologia Veterinaria

Attualmente le linee guida per un corretto utilizzo dei marcatori nella pratica clinica sono generalmente condivise e appaiono sufficientemente codificate. È importante ricordarle brevemente prima di intraprendere una breve trattazione del ruolo dei marcatori nelle principali patologie neoplastiche.

- I. Come regola generale, non è proponibile l'utilizzo dei marcatori circolanti nello *screening* diagnostico dei pazienti asintomatici, come pure nei pazienti a rischio di neoplasia. Questo perché la specificità e la sensibilità diagnostica dei marcatori sono ben lontane da garantire accettabili valori di predittività quando il dosaggio viene applicato su una popolazione a bassa prevalenza di malattia.
- II. L'utilizzazione dei marcatori tumorali nell'approccio diagnostico iniziale può essere giustificata soltanto in casi molto particolari sia per quei marcatori con elevata specificità per un determinato istotipo tumorale, sia per alcuni marcatori in presenza di un preciso sospetto diagnostico. La valutazione del dato deve comunque essere sempre eseguita in associazione con altre metodiche diagnostiche cliniche e/o strumentali.
- III. L'impiego più razionale e proficuo dei marcatori tumorali consiste nell'interpretare le loro modificazioni nel tempo mediante il confronto di dosaggi seriati. Poiché i livelli del marcatore sono generalmente correlati con la presenza e l'estensione della neoplasia, le variazioni positive o negative del marcatore riflettono quasi sempre la progressione o la regressione del quadro neoplastico.
- IV. La determinazione dei marcatori tumorali all'atto della diagnosi di neoplasia e prima di qualsiasi intervento terapeutico può costituire un aiuto nella stadiazione e, in taluni casi, può possedere anche un significato e valore prognostico.

Carcinomi del tratto colo-rettale

A circa 40 anni dalla sua scoperta e dai suoi primi utilizzi nella routine diagnostica, l'*antigene carcinoembrionale* (CEA) costituisce ancora il marcatore tumorale di riferimento per questo gruppo di neoplasie. In questi tumori le concentrazioni ematiche e le percentuali di positività del marcatore aumentano in rapporto all'estensione clinica della malattia raggiungendo i valori più elevati nelle forme metastatizzate. Innalzamenti delle concentrazioni del CEA non sono limitati alle neoplasie del tratto colo-rettale, ma si rinvengono anche in numerose altre patologie oncologiche dell'apparato digerente, respiratorio, genitourinario e nel carcinoma della mammella. Una non trascurabile positività del CEA è osservabile anche in occasione di svariate malattie non neoplastiche, in particolare in presenza di malattie infiammatorie sia di tipo acuto che cronico. Tra queste possiamo citare, a titolo esemplificativo, cirrosi epatica, colelitiasi, colangiti, ascessi epatici, pancreatiti, coliti, gastriti, bronchite cronica, broncopolmoniti. Il marcatore non può essere utilizzato come test di *screening*. Gli studi in cui il marcatore è stato valutato con queste finalità hanno dimostrato che per ogni caso diagnosticato da aumentati valori del marcatore esistono almeno 250 casi falsamente positivi. Anche considerando popolazioni a più elevata prevalenza di malattia (pazienti sintomatici), la predittività del test non raggiunge livelli tali da consentirne un utilizzo con finalità diagnostiche. La valutazione del CEA al momento della diagnosi può assumere un significato prognostico. Questo è solo in parte riconducibile all'associazione tra livelli del marcatore ed estensione della neoplasia in quanto diversi studi hanno dimostrato che i valori preoperatori del CEA hanno un significato prognostico indipendente rispetto alla stadiazione patologica della neoplasia. Nel caso di radicalità chirurgica, le concentrazioni di CEA si normalizzano nell'arco di 4-6 settimane dopo l'intervento di asportazione della neoplasia. Il riscontro di valori persistentemente elevati dopo tale intervallo di tempo è altamente indicativo di mancata radicalizzazione o di malattia metastatica. Nella pratica clinica l'utilizzo più frequente e consolidato della valutazione del CEA è quello che prevede il suo dosaggio durante il follow-up del paziente asintomatico e trattato radicalmente allo scopo di identificare precocemente un'eventuale ripresa di malattia. In questa situazione è opportuno ricordare che non sempre il marcatore rappresenta il primo segno di ripresa della malattia neoplastica, in quanto in una percentuale sia pur non elevata dei casi il marcatore si positivizza tardivamente o non si positivizza affatto. Questo implica che la sorveglianza del paziente in follow-up non può basarsi esclusivamente sulla valutazione del CEA, ma l'esame deve essere considerato complementare alle altre metodiche radiologiche. Nel corso del follow-up possono osservarsi anche delle false positività del CEA. Queste possono essere agevolmente riconosciute quando vengono adottati dei semplici criteri discriminanti. In primo luogo, di fronte ad un risultato positivo di CEA, il dato deve essere ricontrollato nell'arco di un breve periodo di tempo (1-2 settimane), associando anche un'attenta valutazione della funzionalità renale ed epatica, in quanto l'alterazione dei due emuntori costituisce una frequente causa di innalzamento del marcatore. Inoltre, bisogna escludere la presenza di quelle patologie infiammatorie che possono determinare un transitorio aumento dei valori circolanti del marcatore. Un ulteriore utilizzo del CEA è quello del monitoraggio dei trattamenti nei pazienti con malattia metastatica, situazione in cui il marcatore risulta positivo in oltre l'85% dei casi. È ormai consolidato che il dosaggio del CEA rappresenta lo strumento più semplice, efficace ed economico per monitorare la risposta della malattia alle terapie instaurate. Innalzamenti del marcatore in corso di terapie antitumorali sono altamente suggestive di progressione neoplastica e, pertanto, possono di per sé giustificare l'interruzione del trattamento comportando così un possibile miglioramento della qualità di vita per il paziente e un contenimento dei costi economici.

Carcinoma mammario

Il carcinoma mammario è la neoplasia in cui l'applicazione dei marcatori tumorali appare particolarmente discussa e controversa. I motivi sono molteplici e risultano attribuibili, oltre all'evidente importanza sociosanitaria di tale neoplasia, anche ad alcuni limiti diagnostici dei marcatori.

Numerosi marcatori sono stati proposti nel corso degli anni per lo studio del carcinoma mammario, ma, attualmente, nella pratica clinica le scelte possono essere limitate al CEA, alle citocheratine circolanti (TPA, TPS, Cyfra 21.1) e, soprattutto, alla mucina definita come *MUC1* e dosabile con i test per CA 15.3, MCA, CA 549, CASA, MSA, ecc. La *MUC1* deve essere considerata attualmente come il marcatore di riferimento per il carcinoma mammario. Nella pratica, a questa mucina può essere eventualmente associato anche il dosaggio del CEA o di una citocheratina circolante. Come nel caso delle altre neoplasie, anche per il carcinoma mammario le concentrazioni del marcatore e i relativi valori di sensibilità diagnostica sono dipendenti dall'estensione del processo neoplastico. Tuttavia, in questa patologia, il dato più significativo è la sensibilità estremamente bassa riscontrabile nelle forme locali o solo localmente avanzate. Analizzando il CA 15.3, che è il marcatore mucinico di riferimento, si può riscontrare che la sensibilità diagnostica di questo marcatore non supera il 10% nello stadio I, è di circa il 15-20% nello stadio II, mentre nello stadio III raggiunge circa il 30%. Solo nelle forme metastatizzate il marcatore offre sensibilità apprezzabili che possono, esaminando le diverse casistiche, raggiungere globalmente l'80%. Questi dati sono sufficienti per comprendere l'inutilità del dosaggio dei marcatori effettuato con finalità di diagnostiche o di diagnosi precoce. Una valutazione basale, cioè a diagnosi accertata di carcinoma mammario, può costituire un aiuto nella stadiazione (elevati livelli del marcatore sono generalmente incompatibili con una malattia solo localmente avanzata) o potrebbe possedere un significato prognostico. Tuttavia, anche a questo riguardo, i risultati disponibili non sono univoci e conclusivi. L'utilizzo dei marcatori tumorali nel carcinoma mammario è, pertanto, limitato allo studio della malattia avanzata allo scopo di dimostrarne precocemente l'insorgenza e di valutarne l'evoluzione in risposta ai trattamenti antineoplastici. Numerosi studi hanno documentato che la valutazione periodica del marcatore durante il follow-up può, in una percentuale non trascurabile di casi, fornire un segnale precoce di ripresa di malattia. Questo si verifica con elevata frequenza nel caso delle metastasi viscerali, mentre per le recidive loco-regionali il ruolo del marcatore è limitato, in quanto incrementi apprezzabili sono individuabili in meno di un terzo dei casi. Percentuali intermedie di sensibilità si raggiungono nelle pazienti con localizzazioni scheletriche, dove la sensibilità del marcatore dipende dall'entità del coinvolgimento osseo o dal numero di localizzazioni presenti. Il dato sintetico che emerge dalla revisione delle diverse casistiche è che nel caso di ripresa di malattia (sia locale che a distanza) il marcatore costituisce un evento precoce in circa i due terzi dei casi, mentre nel rimanente terzo il marcatore si positivizza tardivamente o non si positivizza affatto. Nelle diverse esperienze, l'anticipo diagnostico è variabile, ma generalmente è compreso tra 2 e 9 mesi. Il secondo utilizzo della valutazione dei marcatori nei pazienti con neoplasia mammaria clinicamente avanzata prevede il loro impiego nel monitoraggio delle terapie antineoplastiche. A questo riguardo esiste un ampio consenso sul fatto che le variazioni periferiche del marcatore corrispondono generalmente ad analoghe variazioni della massa neoplastica. I dati ricavabili dalla letteratura e che emergono dalla pratica clinica indicano che la concordanza tra variazione del marcatore ed evoluzione della malattia non è identica nel caso di un quadro patologico in progressione o in remissione. Infatti, la predittività del test è di circa l'85% nelle pazienti con malattia non responsiva (livelli del marcatore in aumento), mentre questa scende al 70% nelle pazienti responsive (livelli del marcatore in diminuzione). Questo significa che in una percentuale non trascurabile dei casi si può osservare un incremento dei valori del marcatore pur essendo, o sembrando, la neoplasia responsiva ai trattamenti in atto.

Carcinoma ovarico

Il marcatore di riferimento per il carcinoma ovarico è rappresentato dal CA 125. Questo marcatore è particolarmente associato all'istotipo sieroso, mentre l'istotipo mucinoso determina meno frequentemente un innalzamento dei valori del marcatore. Analogamente agli altri marcatori, le concentrazioni sieriche del CA 125 e le percentuali di positività risultano influenzate dall'estensione clinica della neoplasia. Negli stadi I e II le percentuali di positività si attestano attorno al 50%, mentre aumentano ad oltre l'80% negli stadi più avanzati. Nonostante gli elevati valori diagnostici anche nelle forme iniziali, diversi studi hanno dimostrato che la determinazione del CA 125 non può essere consigliata, al di fuori di studi clinici, come strumento routinario di *screening* o di diagnosi precoce. Infatti, il tasso di risultati falsamente negativi risulta troppo elevato, mentre troppo bassa è la predittività del dato positivo (generalmente attorno al 15%). Questo, oltre a determinare ansia e ingiustificate paure nella paziente, comporta l'adozione di ulteriori approfondimenti diagnostici invasivi che si rivelano inutili nella maggior parte dei casi. Numerose, infatti, sono le cause che possono comportare un innalzamento delle concentrazioni sieriche di CA 125 e tra queste ricordiamo le condizioni in grado di danneggiare le sierose peritoneale, pleurica e cardiaca, l'insufficienza renale, le patologie epatiche e polmonari, ecc. L'inquadramento diagnostico delle masse pelviche, con i relativi problemi di diagnosi differenziale, non può quindi essere affidato alla sola valutazione del CA 125. Tuttavia, un reperto ecografico sospetto associato ad un

valore di CA 125 superiore a 65 U/mL riesce a predire la presenza di un carcinoma ovarico con una sensibilità di circa il 90%, alla quale si associa una specificità del 95%. A diagnosi accertata di carcinoma ovarico, la valutazione del CA 125 fornisce importanti informazioni che riguardano la prognosi, il monitoraggio delle terapie e la sorveglianza della paziente in follow-up. Per quanto riguarda il primo aspetto, è dimostrato che i valori preoperatori del CA 125 costituiscono il più importante fattore prognostico nelle pazienti con carcinoma ovarico in stadio I. In questo gruppo di pazienti, la dimostrazione di valori del marcatore superiori a 65 U/mL conferiscono un rischio di morte di oltre 6 volte superiore rispetto a pazienti con valori inferiori del marcatore. Anche nelle pazienti con carcinoma ovarico in fase più avanzata la valutazione del CA 125 mantiene un significato prognostico. Ad esempio, nelle pazienti sottoposte a chemioterapia la persistenza di valori elevati del marcatore dopo i primi due cicli di trattamento rappresenta l'indice maggiormente predittivo di ripresa precoce di malattia. La valutazione del CA 125 è inoltre lo strumento diagnostico più sensibile per monitorare l'efficacia delle terapie instaurate: l'entità della variazione nel tempo del marcatore viene proposta come criterio elettivo per definire e misurare il grado di risposta della neoplasia ai trattamenti, anche se a riguardo esistono ancora alcune incertezze in termini di standardizzazione (tempo e frequenza delle determinazioni del marcatore, percentuale della sua riduzione, ecc.). L'incremento progressivo delle concentrazioni del marcatore durante la terapia attestano, con buona predittività, la progressione di malattia e possono, pertanto, giustificare la sospensione del trattamento in atto o un cambiamento dello schema terapeutico. I controlli periodici del CA 125 durante il follow-up delle pazienti in remissione possono documentare precocemente (fino a 6 mesi di anticipo) e con buona accuratezza (sensibilità di circa l'85% e specificità superiore al 95%) la ripresa del processo neoplastico.

Carcinoma prostatico

Il marcatore di riferimento per questa neoplasia è rappresentato dall'*antigene prostatico specifico* (PSA). Le elevate caratteristiche di sensibilità e specificità diagnostica di questo marcatore hanno praticamente relegato in una posizione marginale l'utilizzo della classica fosfatasi acida prostatica (PAP). Il PSA è senza dubbio il marcatore tumorale più conosciuto anche in ambiti non specialistici e il motivo del grande interesse nei suoi confronti trae origine dal fatto che il marcatore è stato proposto praticamente in tutta la diagnostica del carcinoma prostatico, a partire dai programmi di *screening* di massa e di diagnosi precoce fino al monitoraggio dell'evoluzione della malattia in fase clinicamente avanzata. Il PSA è un prodotto della cellula epiteliale prostatica differenziata che in condizioni fisiologiche viene secreto nel fluido seminale. La capacità di sintetizzare e secernere PSA viene mantenuta anche quando il tessuto epiteliale va incontro a processi di proliferazione sia di natura benigna che maligna. In condizioni di integrità anatomica dell'organo, solo modiche quantità del marcatore possono essere dimostrabili nel sangue periferico (concentrazioni inferiori a 2,5 ng/mL nel 75% dei casi o inferiori a 4,0 ng/mL nel 90%). Quando l'organo è sede di processi che ne condizionano un sovvertimento strutturale, quantità maggiori di PSA vengono rilasciate in circolo. Da un punto di vista pratico, questo significa che un aumento dei valori normali di PSA circolante (> 4 ng/mL) non sono esclusivi della presenza di un carcinoma, ma possono riscontrarsi anche in altre condizioni non neoplastiche, quali l'ipertrofia benigna e le prostatiti, o in situazioni che possono comportare una stimolazione, sia pur temporanea, dell'organo come l'esplorazione digitale del retto, l'ecografia transrettale, ecc. Numerosi studi hanno dimostrato che il dosaggio del PSA, da solo o in associazione ad altre metodiche di diagnosi quali l'esplorazione rettale o l'ecografia transrettale, è in grado di svelare l'esistenza di neoplasie prostatiche quando viene applicato nello *screening* di una popolazione asintomatica. Dall'analisi delle diverse casistiche emerge che la prevalenza della positività per il PSA è funzione dell'età della popolazione sottoposta a *screening* ed è generalmente di circa il 5% nei soggetti con età compresa tra i 50 e i 60 anni, del 10% nella fascia di età tra i 60 e i 70 anni e di circa il 20% nei soggetti con oltre i 70 anni. Nonostante la diversa prevalenza registrata nelle varie fasce d'età, la predittività di un PSA positivo (cioè la probabilità che ad esso si associ la presenza di un carcinoma) appare indipendente dall'età del paziente e, nelle diverse casistiche, è compresa tra il 15 e il 30%. Il fatto che la predittività del PSA risulta indipendente dall'età significa che l'aumento di incidenza di neoplasie dovute all'aumentare dell'età controbilancia la diminuzione della specificità del test al crescere dell'età. Naturalmente, la predittività è tanto più elevata quanto più elevate sono le concentrazioni del marcatore: in particolare per concentrazioni di PSA comprese tra 4 e 10 ng/mL la predittività media è di circa il 20%, mentre per concentrazioni superiori a 10 ng/mL è di circa il 50%. Gli studi fino ad ora condotti dimostrano in maniera concorde che la *detection rate* di carcinomi prostatici che può essere ottenuta adottando nello *screening* il PSA è di circa il 3%. Circa la metà dei carcinomi svelati dal PSA si rivelano alla stadiazione patologica come neoplasie ancora confinate alla prostata. Anche per questo ultimo aspetto è di importanza determinante il valore di concentrazione del marcatore e, a tale riguardo, per concentrazioni del marcatore maggiori di 10 ng/mL la probabilità che la neoplasia sia extracapsulare è estremamente elevata.

Accertata istologicamente la presenza di una neoplasia prostatica, i valori basali di PSA possono fornire indicazioni sull'estensione patologica della neoplasia. Da un punto di vista metodologico, è importante ricordare che per evitare falsi innalzamenti del PSA e, quindi, per garantire l'attendibilità del risultato del dosaggio, il prelievo deve essere

eseguito prima di qualsiasi manipolazione della prostata e, soprattutto, prima dell'accertamento biptico. Oltre che nell'inquadramento del paziente con malattia clinicamente limitata, la valutazione del PSA è utile anche nell'esclusione di possibili metastasi a distanza e, in particolare, a livello scheletrico. Infatti, nei casi con PSA inferiore a 10 ng/mL la probabilità che siano presenti metastasi ossee è inferiore all'1%. L'elevata predittività della determinazione può rendere superflua l'adozione di ulteriori esami di stadiazione (scintigrafia ossea, Rx scheletro) con conseguente contenimento dei costi e dell'esposizione del paziente a radiazioni ionizzanti.

PSA come indice prognostico.

Alla valutazione del PSA viene fatto ampiamente ricorso per il monitoraggio delle terapie, sia nel caso dei trattamenti instaurati per le forme localizzate (prostatectomia chirurgica o radiante) che per la terapia delle neoplasie clinicamente avanzate (ormono o chemioterapia). Nel primo caso, la valutazione del PSA fornisce informazioni sulla radicalità dei trattamenti e, quindi, sul rischio di ripresa di malattia. Dopo intervento di prostatectomia radicale le concentrazioni sieriche di PSA dovrebbero divenire indosabili entro circa un mese dall'intervento. La persistenza di concentrazioni apprezzabili del marcatore sono indice di malattia residua e frequentemente si associano ad una ripresa precoce del quadro patologico. I metodi di dosaggio più ampiamente diffusi forniscono come limite inferiore di misura concentrazioni di PSA pari 0,4 ng/mL. In tempi recenti sono stati proposti metodi più sensibili con limiti di misura pari a 0,01 ng/mL o, addirittura, pari a 0,005 ng/mL (metodi ultrasensibili) che offrirebbero il vantaggio di documentare ancora più precocemente la ripresa di malattia nei pazienti sottoposti a prostatectomia. È opportuno tuttavia rilevare che il reale impatto clinico di questi metodi merita di essere confermato su casistiche più ampie. Il PSA viene correntemente valutato anche per il monitoraggio delle terapie mediche nei pazienti con carcinoma clinicamente avanzato. Questo utilizzo nasce dal presupposto che le modificazioni delle concentrazioni del marcatore osservabili perifericamente siano espressione esclusiva di analoghe variazioni della massa neoplastica indotte dai trattamenti. Questo presupposto viene generalmente rispettato, anche se bisogna tenere presente l'esistenza di situazioni in cui il risultato della valutazione del PSA come parametro di monitoraggio deve essere interpretato con cautela. In primo luogo, occorre ricordare che la sintesi del PSA è strettamente controllata dagli androgeni, per cui le terapie ormonali che comportano una deplezione androgena possono di per sé determinare una caduta dei valori del marcatore indipendentemente dalla diminuzione della massa neoplastica. Ciò significa, sotto il profilo clinico, che le riduzioni di PSA che frequentemente si osservano all'inizio della terapia ormonale nei pazienti con carcinoma prostatico in fase avanzata, non sempre sono predittive di risposta al trattamento. Considerazioni analoghe, sia pur da applicare in un contesto differente, valgono anche per la valutazione del PSA nei pazienti in trattamento con inibitori della 5'- α reduttasi (finasteride) per iperplasia prostatica benigna. In questa situazione i valori di PSA sono abnormemente bassi (generalmente la metà di quelli riscontrabili nei soggetti non in trattamento) e questo deve essere tenuto in considerazione per evitare errori interpretativi del risultato di laboratorio.

Numerosi studi attestano l'efficacia della valutazione del PSA nella sorveglianza del follow-up nei pazienti trattati radicalmente per carcinoma prostatico. Esiste ampio consenso sul fatto che un innalzamento delle concentrazioni del marcatore costituisce il segno più precoce di ripresa di malattia.

INDAGINI SULLE CAUSE DI MORTE DI BOVINI ADULTI IN ALLEVAMENTI DELLA PROVINCIA DI LODI

Invernizzi E., Ferri G.*, Luini M., Riccaboni P.***, Vezzoli F.

*Sezione Diagnostica di Lodi, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna; * Dipartimento di Prevenzione Veterinaria, ASL della Provincia di Lodi; *** Sezione di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviare, Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria – Università degli Studi di Milano*

La mortalità nei bovini interessa circa il 2,7% dei soggetti di età superiore ai 24 mesi in Lombardia e solo raramente ne vengono indagate le cause. Lo scopo di questo studio è quello di indagare le cause del fenomeno e di valutarne i principali fattori di rischio aziendale. La ricerca si è svolta in 57 aziende di bovine da latte con 101 autopsie in campo e la raccolta di dati anamnestici aziendali (strutture, gestione, livello sanitario, alimentazione) per la valutazione dei principali fattori di rischio. In ogni caso è stato eseguito un esame anatomopatologico con campionamento seguito da accertamenti di tipo microbiologico e istopatologico. Per tutti i casi indagati è stata individuata una patologia come causa primaria di morte ed eventuali patologie concomitanti e/o predisponenti. Le patologie riscontrate hanno riguardato più frequentemente l'apparato digerente (70) e solo in minor misura gli apparati genitale (7), mammario (7), cardio-circolatorio (6) e respiratorio (5). Tra le patologie enteriche, la più frequentemente osservata è stata l'enterotossitemia da *C. perfringens* (46) presente come unica entità patologica (38) o in associazione a mastite (4), metrite (1) pericardite (1), neoplasia (1), malformazione cardiaca (1). Il principale reperto anatomopatologico era una grave enterite emorragica a carico di ampi tratti del digiuno, con un contenuto intestinale liquido di colore rosso vinaccia. In una proporzione significativa di questi casi, *C. perfringens* era presente nel contenuto intestinale con cariche superiori a 107 UFG/g. L'esame istologico eseguito da tratti intestinali colpiti ha creato problemi interpretativi per la frequente presenza di reperti di autolisi post-mortale, comune nei ruminanti ed aggravato dal fatto che buona parte delle necrosopie fosse stata effettuata nel periodo estivo. Sia nei campioni freschi, in cui è evidente una flogosi necrotico-emorragica oltre che un comune infiltrato rotondocellulare (linfoplasmacellulare e mastocitario), sia in quelli marcatamente autolitici erano presenti numerosi aggregati di bacilli Gram positivi riconducibili morfologicamente a clostridi. Questo studio ha permesso di individuare nelle forme enteriche acute riferibili a enterotossitemia la causa più frequente di morte improvvisa di animali adulti del territorio considerato. Tali forme, come è risultato dall'analisi dei dati anamnestici aziendali sono collegate anche a fattori di tipo gestionale e alimentare. Per superare le criticità emerse, ulteriori indagini dovranno essere eseguite con autopsie eseguite più precocemente possibile e su animali macellati di necessità o morti durante il trasporto al macello.

Parole chiave: Bovini adulti, morte in allevamento, enterotossitemia, clostridi.

INVESTIGATIONS ON CAUSES OF DEATH IN ADULT CATTLE IN FARMS OF THE PROVINCE OF LODI

The death of adult cattle causes severe economical losses. During 2004 in the province of Lodi 101 cows were necropsied and samples for microbiology and histological examination were collected. Data concerning animals health, management, nutrition and housing were also recorded. Most of deaths were due to a severe and acute haemorrhagic enteritis associated with *C. perfringens*. In these cases a severe and diffuse lysis of the intestinal wall and large amount of Gram positive rods were histologically detected. Scattered mastocytes were frequently observed in the submucosa and to a lesser degree in the mucosa.

Key words: Adult cattle, causes of death, enterotoxemia, clostridia.

FIBROMATOSI NODULARE DELLA LEPRE: CARATTERISTICHE MACROSCOPICHE, ISTOLOGICHE ED ULTRAISTRUTTURALI DI UNA PATOLOGIA RICOMPARSA IN ITALIA

Rondena Marco, Cerioli Monica¹, Grilli Guido, Caccia Mario², Finazzi Mario, Lavazza Antonio¹

Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria.

¹ *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia, Sezione di Brescia*

² *Ufficio Provinciale della Caccia, Provincia di Novara*

La fibromatosi nodulare della lepre, descritta per l'ultima volta in Italia 45 anni fa, è una malattia da leporipoxvirus ad elevata morbilità e decorso benigno che presenta un quadro anatomopatologico consistente in lesioni di tipo nodulare, solide, spesso multifocali ed ulcerate, a livello cutaneo nelle regioni della testa ed estremità degli arti. Negli ultimi anni sono ricomparsi quadri compatibili con fibromatosi in lepri allevate, d'importazione e selvatiche nel nord Italia. In questa segnalazione sono state riconsiderate le caratteristiche istologiche ed ultramicroscopiche delle lesioni di animali provenienti da un grave focolaio che ha interessato 250 soggetti. Alcune lepri con gravi lesioni sono state sottoposte a necropsia e campioni di cute sono state sottoposte ad esame istologico (colorazioni E.E. e PAS) ed ultramicroscopico. Si sono adottate tecniche ultrastrutturali classiche (fissazione chimica in glutaraldeide 2.5% e inclusione in resina epossidica) e di crioultramicroscopia (fissazione in paraformaldeide 2%, crioprotezione con saccarosio, congelamento in azoto liquido e sezionamento con ultracriomicrotomo), quest'ultime anche in associazione ad immunomarcatura con oro colloidale (immunogold) utilizzando un Mab anti-Myxovirus del coniglio. Le lesioni esaminate sono microscopicamente ed istologicamente compatibili con la fibromatosi della lepre. Con metodi ultramicroscopici si sono evidenziate numerose particelle virali nel citoplasma di fibrociti, morfologicamente riferibili a poxvirus. La negatività riscontrata in immunogold ha escluso trattarsi di un ceppo di myxovirus. La fibromatosi è ricomparsa sul territorio italiano con caratteristiche cliniche e patologiche, sia a livello istologico che ultrastrutturale, sovrapponibili alla malattia descritta negli anni '60. La crioultramicrotomia associata a tecniche di immunomarcatura può risultare un valido metodo per l'identificazione e caratterizzazione dei virus e degli antigeni tissutali.

Parole chiave: Lepre, Poxvirus, Fibromatosi, Ultracriomicroscopia.

OUTBREAK OF HARE FIBROMATOSIS IN NORTH ITALY: MACROSCOPICAL, HISTOLOGICAL AND ULTRASTRUCTURAL FINDINGS.

Hare Nodular Fibromatosis (HNF) is a disease of hares, different from myxomatosis, caused by a Leporipoxvirus. The clinical disease is characterised by single or multiple protruding solid tumours, occurring mostly on the ears and legs. Morbidity is usually high but mortality is low and mostly related to bacterial secondary infections. The majority of adult hares affected spontaneously recover. During an outbreak of fibromatosis in farmed game hares, samples of typical tumours taken at necropsy were both submitted to routine histopathology (HE staining and PAS) and prepared for ultrastructure (standard and ultracryo methods). Immunomarcature with colloidal gold (immunogold) was performed on grids using a monoclonal anti-myxomatosis antibody. Lesions observed were macroscopically and histologically consistent with HNF. Electron microscopy revealed the virus presence in cytoplasmic vesicles; immunogold stained negative excluding an involvement of Myxovirus. Hare fibromatosis is reappeared in Italy after more than 40 years showing the same clinical and pathological characteristics originally described. Cryoultramicrotomy eventually associated to immunodetection could be a valid aid to identify and characterise virus and tissue antigens.

Key words: Hare, Poxvirus, Fibromatosis, Ultracryomicroscopy.

**QUADRI ANATOMOPATOLOGICI IN ABOMASI DI CAPRIOLO (*CAPREOLUS CAPREOLUS CAPREOLUS*)
PARASSITATI**

Pascotto Ernesto, Beraldo Paola, Domenis Mila, Galeotti Marco

Dipartimento di Scienze animali, Facoltà di Medicina veterinaria, Università degli Studi di Udine

Il capriolo (*Capreolus capreolus*) è una specie di grande interesse faunistico-venatorio e di indubbia difficoltà gestionale.

Indagini ecoparassitologiche dimostrano importanti relazioni tra carica parassitaria abomasale nel capriolo e condizioni corporee dei soggetti, ma non esistono informazioni sul danno tissutale determinato da tali infestazioni. Nel presente studio vengono descritti i quadri anatomopatologici abomasali congiuntamente ai risultati di un'indagine parassitologica.

Durante il periodo maggio-ottobre 2004, sono stati campionati gli abomasi di 18 soggetti, abbattuti in caccia di selezione nelle Prealpi Giulie. Ogni organo è stato aperto lungo la grande curvatura e, con una serie di delicati lavaggi, è stato svuotato dal contenuto, utilizzato poi per analisi parassitologiche quali-quantitative. Dopo fotografia e valutazione macroscopica, sono stati prelevati e fissati per l'istologia (formaldeide tamponata al 4%) i campioni standard di mucosa fundica e pilorica ed eventuali lesioni rilevate. Ogni campione è stato processato secondo le tecniche attualmente in uso e successivamente valutato tramite protocollo standardizzato.

Tutti gli abomasi presentavano lesioni istologiche difensive, anche se di intensità molto variabile. Tra le lesioni fundiche, più varie ed importanti di quelle piloriche, i quadri più rappresentati erano, nelle forme "pure" o "complesse": abomasite iperplastico-catarrale, abomasite aspecifica semplice ed abomasite eosinofila. Il basso numero di abomasi valutati ed il costante poliparassitismo non consentono al momento associazioni significative tra le specie parassitarie e/o l'intensità di infestazione e la gravità e la tipologia dei quadri infiammatori. La notevole frequenza di abomasiti iperplastico-catarrali, ritenute da molti autori responsabili di danni fisiopatologici sistemici importanti in altri ruminanti, permette però di sottolineare l'azione patogena svolta nel capriolo da alcuni parassiti abomasali.

Parole chiave: capriolo, capreolus, parassiti abomasali, abomasite, lesioni anatomopatologiche.

**ANATOMOPATHOLOGICAL ASPECTS IN ROE DEER (*CAPREOLUS CAPREOLUS CAPREOLUS*)
ABOMASUM INFECTED BY PARASITES.**

Roe deer is a great importance species in relation to wildlife management. Ecoparasitological analyses show that the abomasal parasitic burden and host body condition are closely related, but it doesn't exist information about tissue damage induced by these parasites. In this study abomasal anatomopathological patterns are described in association with the results of parasitological analysis.

During the period May-October 2004, 18 *Abomasum* of roe deer were collected in game reserve of Julian Prealps. Each *Abomasum* was opened along the *Curvatura major* and the parasitological exams were carried out on its contents after light washing. After photograph and macroscopic evaluation, standard samples of *Fundus abomasi* and *Pars pylorica* were collected and fixed in 10% buffered formaline, and such any other lesion. The samples were processed by means of standards lab techniques and then evaluated through specific protocol.

All the *Abomasum* show histological defensive lesions with variable intensity.

The fundic lesions were the most various and important. Several representative aspects were hyperplastic-catarral, aspecific simple and eosinophilic abomasitis both in "pure" and "complex" form.

At the moment, the low specimen number and constant polyparasitism not allow to associate to the helminthic species and burden with severity and inflammatory patterns.

The frequency of hyperplastic-catarral abomasitis emphasize the pathogenic action of some abomasal parasites in roe deer, in accord with many authors considering them the cause of serious systemic damage in other ruminants.

Key words: roe deer, capreolus, abomasal parasites, abomasitis, anatomopathological lesions.

INTRODUZIONE

Il capriolo (*Capreolus capreolus*) è una specie di grande interesse faunistico-venatorio e di indubbia difficoltà gestionale.

Associazione Italiana di Patologia Veterinaria

Le indagini ecoparassitologiche condotte in questa specie dimostrano importanti relazioni tra carica parassitaria abomasale ed alcuni indici di condizione fisica, quali: peso corporeo (Segonds-Pichon et al., 2000), indici biometrici (Zaffaroni et al., 1997), valutazioni quali-quantitative sul grasso corporeo (Zaffaroni et al., 1997; Tavan et al., 2003). Sono invece estremamente carenti le informazioni concernenti il danno tissutale arrecato da tali parassiti.

Nel presente studio vengono descritti i quadri anatomopatologici abomasali congiuntamente ai risultati di un'indagine parassitologica. Tra gli scopi prefissati:

- i. fornire una prima e preliminare descrizione dei quadri anatomopatologici riscontrabili a carico dell'abomaso del capriolo;
- ii. confrontare le lesioni osservate con quelle descritte in letteratura nelle specie domestiche (ovi-caprini) al fine di esprimere un possibile giudizio di "gravità";
- iii. individuare nel campione valutato eventuali relazioni tra quadri anatomopatologici e qualità/quantità parassiti isolati.

MATERIALI E METODI

Durante il periodo maggio-ottobre 2004, sono stati campionati 18 animali provenienti da abbattimenti in caccia di selezione nelle Prealpi Giulie. Tutti i soggetti sono stati eviscerati dai cacciatori in campo, provvedendo all'isolamento della corata dalla carcassa. I visceri sono stati conservati ad una temperatura di refrigerazione (+1/+5°C) fino al momento del campionamento, avvenuto in media dopo 6h. L'abomaso è stato separato dal resto dell'apparato digerente previa legatura dell'estremità prossimale e di quella distale. L'organo è stato poi aperto lungo la grande curvatura e appoggiato in una vaschetta, dove, dopo una serie di delicati lavaggi, il contenuto abomasale è stato raccolto in un calice graduato, sedimentato, addizionato con glicerolo e, dopo alcune ore crioconservato a -20°C. Al fine di registrare eventuali lesioni macroscopiche l'organo è stato osservato attentamente e sono state eseguite una serie di fotografie secondo un protocollo prestabilito. Da ogni abomaso esaminato sono stati prelevati e fissati per l'istologia (formaldeide tamponata al 4%) campioni standard di mucosa fundica e pilorica e ulteriori campioni ogni qualvolta fossero ravvisate lesioni macroscopicamente evidenti. Da ogni campione abomasale standard sono state ottenute tre sezioni istologiche di parete abomasale, equidistanti, con orientamento trasversale (perpendicolari all'andamento delle *Plicae gastricae*). Tali sezioni sono state ritenute rappresentative della situazione infiammatoria abomasale complessiva alla luce di un confronto con le metodiche utilizzate da altri autori sulla pecora (Amarante et al., 1999; Scott et al., 1998, Huntley et al., 2004) e sulla capra (Perez et al. 2003).

I campioni fissati e "rifilati", sono stati processati e colorati secondo le tecniche routinarie attualmente in uso.

Al fine di standardizzare l'interpretazione istopatologica dei preparati e permettere perciò un successivo confronto tra gli abomasi di diversi soggetti, si è ritenuto necessario stilare un protocollo di valutazione dettagliato (schede e indici parametrici a disposizione presso gli autori).

La classificazione dei quadri infiammatori è stata effettuata secondo le indicazioni suggerite da Marcato (2002). I quadri infiammatori ritenuti frutto di combinazione di due o più forme semplici (pure), sono stati definiti "complessi".

Sul contenuto abomasale crioconservato, riequilibrato a temperatura ambiente, è stata condotta la ricerca dei parassiti abomasali secondo tecniche convenzionali e l'identificazione si è basata sulle chiavi di Skrjabin *et al.* (1961) e Demolin (1984). Per ogni specie elmintica sono stati calcolati gli indici epidemiologici di abbondanza (A), abbondanza relativa (AR) e prevalenza (P) (4).

RISULTATI

Istopatologia Le notevoli differenze nei quadri anatomopatologici fundici rispetto a quelli antrali nello stesso soggetto, hanno dettato la necessità di una classificazione separata. Tutti i campioni hanno evidenziato quadri lesivi di tipo infiammatorio anche se talvolta da ritenersi di entità poco rilevante.

Quadri anatomopatologici nella regione del corpo e del fondo (Tabella 1).

L'analisi dei campioni fundici ha permesso l'identificazione di n.5 quadri infiammatori "semplici" e n.4 quadri "complessi", tra i primi, in ordine di frequenza: abomasite ipertrofica-catarrale (n.3 abomasi); abomasite aspecifica semplice (n.3); abomasite eosinofila (n.2); abomasite edematosa (n.1), abomasite atrofica-catarrale (n.1). L'abomasite ipertrofica-catarrale può essere considerata il quadro infiammatorio più frequentemente riscontrato perché presente anche in 5 dei 7 quadri infiammatori complessi. Nella forma cronica, peraltro più rappresentata, l'aspetto macroscopico appare tipico (figura 1): pieghe gastriche (*Plicae gastricae*) rilevate (talvolta cerebroidi) ed edematose, mucosa ricoperta da muco trasparente gelatinoso. Sotto il profilo istologico il quadro è dominato dall'ipertrofia(plasia)-metaplasia delle ghiandole fundiche (figura 2). L'ispessimento dello strato ghiandolare (altezza media: 1287±158 µm) è statisticamente significativo (Test t) e si rileva un disegno ondulato del profilo della mucosa. Il fenomeno di metaplasia è di tipo nettamente mucoso e si verifica per lo più nella porzione apicale delle ghiandole che assumono spesso un'organizzazione nettamente tubulare rettilinea. Questo fenomeno incrementa enormemente la profondità delle fossette

gastriche (*Foveolae gastricae*) e perciò il quadro appare riferibile ad una vera metaplasia “pseudopilorica”. L'altezza della porzione ghiandolare con cellule parietali (*Glandulocytii parietales*) non si discosta significativamente da quella registrata in abomasia non iperplastici (Test t) e perciò, considerata una complessiva riduzione di cellule parietali negli strati esaminati (quantificazione secondo il protocollo), è possibile ipotizzare una riduzione reale delle cellule secernenti in tutta la mucosa. Leggermente meno rappresentata (n.3), l'abomasite aspecifica semplice partecipa a 4 dei 7 quadri infiammatori “complessi” rilevati. Sia nella forma superficiale che in quella profonda i quadri macroscopici appaiono poco caratteristici. All'osservazione microscopica il quadro lesivo assume carattere di maggior tipicità e gravità. Un infiltrato infiammatorio linfo-plasmacellulare coinvolge lo strato ghiandolare in forma diffusa ed assume carattere perivasale-denso nella lamina propria. La sottomucosa mostra un infiltrato prevalentemente linfocitario diffuso di discreta entità. In alcuni soggetti, nella tonaca muscolare, è visibile un infiltrato multifocale misto (linfociti, plasmacellule ed eosinofili) ed appare molto interessante la presenza di manicotti perineurali per lo più plasmacellulari che configurano la lesione come vera e propria neurite (figura 3).

L'abomasite eosinofila, malgrado osservabile nella sua forma “semplice” in solo n. 2 abomasia, rientra a fare parte di ben n.4 quadri infiammatori “complessi”. I granulociti eosinofili si concentrano particolarmente alla base delle ghiandole fundiche e nella sottomucosa (intenso infiltrato multifocale). Quasi costante l'associazione di uno stato edematoso con notevole linfangectasia.

Quadri anatomopatologici nella regione pilorica (Tabella 2)

L'analisi dei campioni pilorici ha permesso l'identificazione di soli n.2 quadri infiammatori “semplici” e n.2 “complessi”, tra i primi, n.8 abomasia mostravano antrite aspecifica semplice e solo n.3 antrite ipertrofica. L'antrite aspecifica s., quasi esclusivamente superficiale, è stata rilevata nel 60% degli abomasia esaminati. Sotto il profilo istologico si osservano infiltrati prevalentemente linfo-plasmacellulari spesso a carattere perivasale. L'antrite ipertrofica, non sembra raggiungere mai il livello di gravità visibile nella porzione fundica. All'ispessimento della mucosa, non sempre percettibile, talvolta si aggiunge la presenza di abbondante muco, edema e lieve arrossamento. Le rilevazioni microscopiche consentono di apprezzare un discreto incremento dello spessore dello strato ghiandolare (altezza media: $1250 \pm 265 \mu\text{m}$) associato ad un profilo ondulato della superficie luminale. I leucociti globulari possono essere piuttosto numerosi soprattutto nella porzione apicale delle ghiandole.

Parassitologia Nel complesso sono state identificate 11 diverse specie elmintiche. Gli indici epidemiologici calcolati per ogni specie sono riportati nella tabella 3. Il numero medio di specie per ospite è risultato pari a 5.5 (ds ± 1.22).

DISCUSSIONE

La valutazione scomposta delle lesioni presenti in “zona fundica” ed in “zona pilorica” ha permesso di evidenziare una maggior varietà dei quadri anatomopatologici fundici ed una sostanziale omogeneità di quelli pilorici. Questa osservazione consente di sottolineare l'importanza del campionamento in sede fundica nella definizione dei quadri di abomasite.

Per quanto concerne la “gravità” delle lesioni, i quadri di abomasite ipertrofica-catarrale non possono essere sottovalutati. Tale tipologia di abomasite già descritta da molti autori nella pecora (Anderson et al., 1988; Scott et al., 1998; Amarante et al., 1999) e nella capra (Rahman e Collins, 1991) in relazione alla presenza di parassiti, è ritenuta responsabile di importanti alterazioni fisiopatologiche conseguenti alla riduzione del pH gastrico (Simpson, 2000).

Anche se il costante poliparassitismo ha reso molto difficile l'attribuzione dei quadri anatomopatologici alle singole specie parassitarie isolate, è interessante notare che, i quadri “semplici” o “complessi” di abomasite ipertrofica-catarrale sono risultati associati ad elevate cariche parassitarie (>800 adulti/abomaso) nell'ambito di poliparassitismo da almeno 5 specie elmintiche. L'interpretazione della gravità dei quadri di abomasite aspecifica semplice appare complessa per la carenza di letteratura sull'evoluzione di questi fenomeni patologici anche nelle specie domestiche. Ancor più incerta appare la valutazione delle abomasite eosinofili. Diversi autori hanno osservato relazioni tra il numero di eosinofili nella parete abomasale e la carica parassitaria (Oliveira-Sequeira et al. 2000; Balic et al. 2002). In particolare, gli eosinofili aumenterebbero dopo precedentemente sensibilizzate ad alcuni parassiti (Shelton e Griffiths, 1967) suggerendo un ruolo importante di queste cellule nella resistenza alle parassitosi (Balic et al., 2000). Resta comunque ancor oggi da chiarire il bilancio tra l'azione antiparassitaria degli eosinofili ed i danni tissutali indotti da queste cellule. Appaiono infine interessanti i quadri infiltrativi rilevati a carico del plesso mioenterico e dei fasci nervosi, non si possono escludere relazioni con le alterazioni della motilità gastrointestinale rilevate nella pecora durante infestazioni da *Ostertagia ostertagia*, *Trichostrongylus axei* ed *Haemonchus contortus* (Fox, 1997).

CONCLUSIONE

La preliminare classificazione delle abomasite effettuata nella presente ricerca, assume rilevanza scientifica per la carenza di informazioni in letteratura. Il basso numero di abomasia valutati ed il costante poliparassitismo non consentono al momento associazioni significative tra le specie parassitarie e/o l'intensità di infestazione e la gravità e

Associazione Italiana di Patologia Veterinaria

tipologia dei quadri infiammatori. La notevole frequenza di abomasiti ipertrofico-catarrali permette però di sottolineare l'azione patogena svolta da alcuni parassiti abomasali nel capriolo. La prosecuzione della ricerca con ulteriori campionamenti, anche in altre aree geografiche, presenta interessanti risvolti nella gestione sanitaria di questo cervide.

BIBLIOGRAFIA

- AMARANTE A.T.F., CRAIG T.M., RAMSEY W.S., DAVIS S.K., BAZER F.W. 1999. Nematode burdens and cellular responses in the abomasal mucosa and blood of Florida native Rambouillet and crossbreed lambs. *Veterinary Parasitology* 80:311-324.
- ANDERSON N, REYNOLDS GW, TITCHEN DA. 1988. Changes in gastrointestinal mucosal mass and mucosal and serum gastrin in sheep experimentally infected with *Ostertagia circumcincta*. *International Journal of Parasitology*. 18(3):325-31.
- BALIC A. , BOWLES V. M. e MEEUSEN E. N. T. 2002. Mechanisms of immunity to *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Parasite Immunology* 24:39-46
- BALIC A., BOWELS V.M., MEEUSEN E.N.T. 2000. Cellular profiles in the abomasal mucosa and lymph node during primary infection with *Haemonchus contortus* in sheep. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 75:109-120.
- FOX M.T. 1997. Pathophysiology of infections with gastrointestinal nematodes in domestic ruminants: recent developments. *Veterinary Parasitology* 72:285-308.
- MARCATO P.S. 2002. Patologia sistematica veterinaria. Edagricole, Bologna.
- OLIVEIRA-SEQUEIRA T.G.C., AMARANTE A.T.F., SEQUEIRA J.L. 2000. Parasitological characteristics and tissue response in abomasum of sheep infected with *Haemonchus spp.* *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinaria Zootecnica* 52(5)
- RAHMAN W.A., COLLINS G.H. 1991. Infection of goats with *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis*: histopathology and pH changes. *British Veterinary Journal* 147(6):569-574.
- SCOTT I., HODGKINSON S.M., KHALAF S., LAWTON D.E.B., COLLETT M.G., REYNOLDS G.W., POMROY W.E., SIMPSON H.V. 1998. Infection of sheep with adult and larval *Ostertagia circumcincta*: abomasal morphology. *International Journal of Parasitology* 28:1383-1392.
- SEGONDS-PICHON A., FERTÈ H., GAILLARD J.M., LAMARQUE F., DUNCAN P. 2000. Nematode infestation and body condition in roe deer (*Capreolus capreolus*). *Game and Wildlife Science* 17(4): 241-258
- SIMPSON H.V. 2000. Pathophysiology of abomasal parasitism: is the host or parasite responsible? *Veterinary Journal* 160:177-191.
- TAVAN N., FERROGLIO E., CICERALE M., ROSSI L. 2003. Indagine sull'elmintofauna gastro-intestinale del capriolo nell'Appennino savonese. *Journal of Mountain Ecology* 7(suppl): 276-278
- ZAFFARONI E., CITTERIO C., SALA M., LAUZI S. 1997. Impact of abomasal nematodes on roe deer and chamois body condition in an alpine environment. *Parassitologia* 39:313-317

RILEVAZIONI MACROSCOPICHE	DIAGNOSI ISTOPATOLOGICA (QUADRI INFIAMMATORI)	CODICE SOGGETTI
Cronica: ispessimento pieghe gastriche con aspetto cerebroide della mucosa; presenza di muco in superficie; rare emorragie puntiformi	<i>Abomasite ipertrofica-catarrale</i>	SC53
Subacuta: lieve ispessimento della mucosa; presenza di muco in superficie; aspetto edematoso pieghe gastriche		SC07; SC54
Superficiale: non si rilevano lesioni	<i>Abomasite aspecifica semplice</i>	SC03, SC12; SC32
Profonda: aspetto edematoso pieghe; aree biancastre ampie a margini indefiniti talora coalescenti		
aspetto edematoso pieghe; discreto ispessimento mucosa; aree biancastre ampie a margini indefiniti talora coalescenti; talvolta notevole congestione	<i>Abomasite eosinofilica</i>	SC13; SC24
evidente l'aspetto edematoso; alcune lesioni nodulari ombelicate (lesioni parassitarie attribuibili ad ostertagine)	<i>Abomasite edematosa</i>	SC22
lieve aspetto edematoso; lieve assottigliamento della mucosa e delle pieghe gastriche multifocale	<i>Abomasite atrofica- catarrale</i>	SC42

Tabella 1: Aspetti macroscopici e relativa classificazione anatomopatologica dei quadri infiammatori "semplici" riscontrati nella porzione fundica dell'abomaso (n.18). I codici dei soggetti si riferiscono alle schede di caccia della riserva.

RILEVAZIONI MACROSCOPICHE	DIAGNOSI ISTOPATOLOGICA (QUADRI INFIAMMATORI)	CODICE SOGETTI
aspetto edematoso, talvolta lieve arrossamento, rare lesioni nodulari ombelicate	Antrite aspecifica semplice	SC12; SC13; SC22; SC30; SC31; SC33; SC38; SC53
ispessimento mucosa con aspetto cerebroide; presenza muco superficiale; lieve arrossamento mucosa	Antrite ipertrofica	SC03; SC07; SC59

Tabella 2: Aspetti macroscopici e relativa classificazione anatomopatologica dei quadri infiammatori "semplici" riscontrati nella porzione pilorica dell'abomaso (n.18). I codici dei soggetti si riferiscono alle schede di caccia della riserva.



Figura 1: Aspetto macroscopico di un caso di abomasite ipertrofica-catarrale: notare lo stato edematoso, l'ispessimento e l'organizzazione cerebroide delle pieghe gastriche (*Plicae gastricae*).

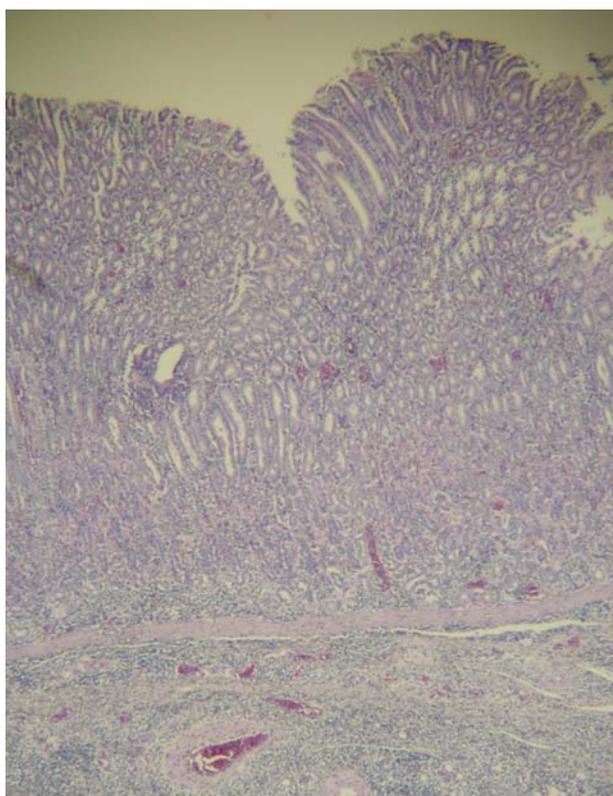


Figura 2: Preparato istologico di mucosa fundica (25X): abomasite ipertrofica-catarrale. Si osserva il profilo ondulato della mucosa, la metaplasia mucosa delle ghiandole fundiche e l'intenso infiltrato cellulare che coinvolge anche gli strati profondi.

PARASSITA	P	A	AR
<i>Teledorsagia circincincta</i>	15.8	6.7	0.9
<i>Spiculopteragia spiculoptera</i>	100.0	199.8	26.2
<i>Spiculopteragia mathevossiani</i>	68.4	26.1	3.4
<i>Ostertagia lyrata</i>	5.3	0.9	0.1
<i>Ostertagia kolchida</i>	89.5	78.5	10.3
<i>Ostertagia ostertagia</i>	5.3	15.6	2.0
<i>Ostertagia leptospicularis</i>	100.0	203.5	26.7
<i>Heamoncus contortus</i>	89.5	166.6	21.8
<i>Tricostrongylus capricola</i>	68.4	42.3	5.5
<i>Tricostrongylus vitrinus</i>	5.3	0.6	0.1
<i>Nematodirus europeaus</i>	5.3	1.3	0.2

Tabella 3: Indici epidemiologici di prevalenza (P), Abbondanza (A) e abbondanza relativa (AR) delle specie elmintiche abomasali identificate nel campione considerato (n.19)

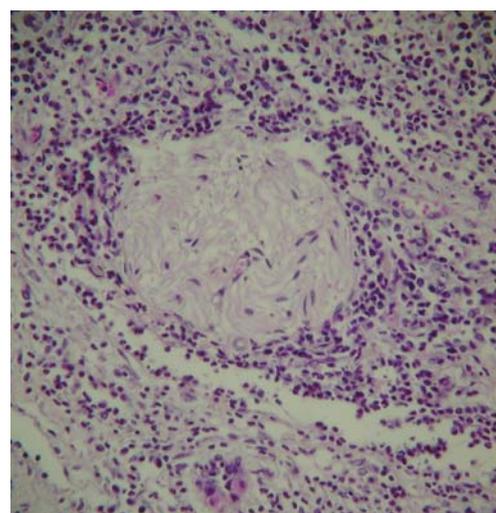


Figura 3: Preparato istologico si sottomucosa (400X): intenso infiltrato cellulare misto in sede perineurale.

EVIDENZIAMENTO DI *MYCOBACTERIUM AVIUM SUBSP. PARATUBERCULOSIS* (MAP) IN TESSUTI OVINI E UMANI

Sanna Maria Paola¹, Farigu Serafina¹, Rocca Stefano¹, Pirino Salvatore¹, Leoni Antonio¹, Sechi Leonardo A.², Lissia Amelia³, Tanda Francesco³, Mingioni Vindice⁴

Istituto di Patologia Generale, Anatomia Patologica e Clinica Ostetrico-Chirurgica Veterinaria¹; Dipartimento di Scienze Biomediche, Sezione di Microbiologia Sperimentale e Clinica²; Istituto di Anatomia e Istologia Patologica³, Università degli Studi di Sassari; Servizio di Anatomia Patologica Ospedale San Francesco, Nuoro⁴.

Agente eziologico della Paratubercolosi (PTBC), infiammazione cronica dell'intestino di un ampio spettro di specie domestiche e selvatiche, è il batterio a lenta crescita e difficile coltivazione *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*. L'esistenza di un coinvolgimento di MAP nel determinismo del Morbo di Crohn (MC), affezione cronica infiammatoria recidivante dell'intestino umano, è stata più volte sospettata ma non ha ancora trovato convincenti conferme sperimentali.

Con l'obiettivo di verificare la distribuzione cellulare di MAP in corso di MC e PTBC, abbiamo condotto prove ibridocitochimiche su intestini umani, di ovini di razza sarda naturalmente e sperimentalmente infetti e su controlli etero- e intra-specifici. Sono stati sviluppati e utilizzati a tal scopo un protocollo specifico di ISH basato sulla rivelazione non radioattiva di un frammento del segmento di inserzione IS900 del DNA di MAP e un protocollo di ISPCR di tipo indiretto, nel quale la rivelazione del tratto di interesse è preceduta dall'amplificazione dello stesso in assenza di marcatori.

I test di ISH hanno consentito di rilevare rari segnali specifici in sede intracitoplasmatica su macrofagi localizzati nella mucosa; tali cellule permissive hanno manifestato la marcatura nei campioni ovini con infezione paratubercolare naturale sia multibacillare che paucibacillare; in questi ultimi la colorazione di Ziehl-Nielsen (ZN), specifica per i batteri alcool-acido resistenti, risultava, invece, negativa. Positività sovrapponibile alla precedente si evidenziava anche nell'ovino con infezione sperimentale paucibacillare, inoculato con il ceppo 43015 ATCC isolato da un paziente affetto da MC. Per quanto riguarda i campioni MC+, marcature venivano reperite negli infiltrati macrofagici soprattutto nella sottomucosa e sottosierosa e in aggregati e noduli di cellule linfoidi. La ISPCR sui campioni di PTBC consentiva di incrementare la quantità e l'intensità dei segnali ottenuti con l'ISH; forti aree di positività venivano rilevate anche nei macrofagi dello strato sottomucoso e in corrispondenza degli aggregati e dei vasi linfatici; sui campioni MC+ i segnali apparivano più numerosi e, inoltre, alcuni campioni inizialmente negativi rivelavano chiaramente la marcatura delle cellule permissive nei contesti lesivi tipici. I controlli fornivano risultati costantemente negativi.

I risultati ottenuti dimostrano che le metodiche utilizzate sono sufficientemente affidabili; l'impiego della ISPCR è tuttavia indispensabile per individuare tutti i citotipi coinvolti nell'infezione, particolarmente nei campioni ovini e umani negativi alla ZN. L'applicazione di corrette tecniche biomolecolari può dunque contribuire in misura sostanziale alla comprensione delle potenzialità zoonotiche della PTBC.

Parole chiave: Paratubercolosi; Morbo di Crohn; MAP; Ibridazione in situ (ISH); PCR in situ (ISPCR).

DETECTION OF MYCOBACTERIUM AVIUM SUBSP. PARATUBERCULOSIS (MAP) IN ANIMALS AND HUMAN TISSUE.

The aim of this work was the detection of MAP in human with CD and in ovine with natural and experimental PTBC, by in "situ" techniques. ISH showed strong signals in the macrophages infiltrating the mucosal and submucosal layers in PTBC samples and positive signals in macrophages of CD cases. Furthermore, ISPCR signals were more numerous than those obtained by ISH. This result indicate that ISPCR is able to detect also less copies of MAP DNA.

Key words: Paratuberculosis; Crohn's disease; MAP; In situ Hybridization (ISH); In situ PCR (ISPCR).

INTRODUZIONE

Il Morbo di Crohn (MC), affezione cronica infiammatoria recidivante dell'intestino umano, presenta alcune similarità cliniche e patologiche con la forma linfocitica/paucimicrobica della paratubercolosi degli animali. Nei primi anni del secolo scorso, Dalziel, descrisse le analogie fra alcuni casi di MC e PTBC, ipotizzò l'origine micobatterica della

Associazione Italiana di Patologia Veterinaria

patologia umana (1). La teoria fu fortemente osteggiata, probabilmente anche a causa dell'estrema difficoltà di isolare e coltivare il micobatterio. Solo grazie all'introduzione di nuovi strumenti diagnostici (PCR) essa ha ripreso vigore. Se in passato, con tecniche esclusivamente colturali, furono isolati MAP (in forma integra e sferoplastica) e numerosi altri micobatteri (2, 3, 4) nel 5% dei pazienti affetti da MC, successivamente l'IS900 PCR per MAP eseguita su vecchie colture allestite a partire da campioni di intestino, risultò positiva nel 30% dei casi (5,6), percentuale che superava i 2/3 allorché la tecnica veniva applicata al DNA estratto dalle biopsie. Questo studio, pubblicato nel 1992, fu il primo a essere condotto direttamente su tessuti intestinali; da allora, nella letteratura internazionale indicizzata, sono comparsi molti altri lavori di questo tipo, nei quali sono stati impiegati svariati protocolli di processazione e di amplificazione; alcuni di essi condussero all'identificazione di MAP in pochi o nella maggioranza dei casi di MC, (7,8,9,10,11) mentre altri fornirono risultati negativi (12,13,14,15,16). I dati contrastanti ottenuti mediante PCR sono stati oggetto di varie interpretazioni; considerevole importanza viene attribuita alla "low abundance" del target e alla difficoltà di ottenere DNA cromosomico da micobatteri, notoriamente assai maggiore che per altri germi (17). Alcuni Autori hanno bypassato tale problema operando "in situ" con sonde molecolari variamente marcate in grado di rivelare direttamente nel contesto tissutale il DNA di MAP, ottenendo intorno al 70% di positività su campioni MC (18,19,20), delle quali solo una parte confermate in PCR. Le difficoltà sperimentali e le variazioni nelle procedure adottate da laboratorio a laboratorio, hanno condizionato l'evidenziazione mediante PCR anche di altri patogeni batterici caratterizzati da low abundance, quali per esempio il micobatterio della tubercolosi nei tessuti in preda ad infiammazione cronica, gli agenti eziologici della malattia di Lyme, della brucellosi e della lebbra linfocitica.

Nonostante lo sviluppo di ricerche ormai più che ventennali, la materia appare controversa; dati definitivi sull'associazione certa di MAP alle lesioni da Morbo di Crohn a tutt'oggi non sono disponibili.

Obiettivo del presente studio è lo sviluppo di tecniche specifiche e sensibili di ISH e PCR in situ atte alla verifica della distribuzione cellulare di MAP in corso di MC e PTBC

Vengono in questa sede esposti i risultati da noi ottenuti mediante esperimenti condotti su intestini umani e di ovini naturalmente e sperimentalmente infetti con l'ausilio di tecniche in situ.

MATERIALI E METODI

CAMPIONI: oggetto della ricerca sono stati:

- n. 8 ovini di razza sarda naturalmente infetti. All'osservazione macroscopica presentavano mucosa intestinale corrugata e ispessita, linfatici sottosierosi prominenti e dilatati, assenza di tessuto adiposo periviscerale e ipertrofia dei linfonodi;
- n. 1 ovino di razza sarda sperimentalmente infettato a 8 mesi per via orale con il ceppo ATCC 43015 (20 ml di 10⁹ batt/ml) e soppresso a 24 mesi di età. Il quadro anatomico-patologico era rappresentato da marcata iperplasia della mucosa del tratto digiuno-ileo e iperplasia delle strutture linfatiche ciecali;
- n. 7 casi di Morbo di Crohn, caratterizzati da ispessimento nodulare della parete accompagnato da iperemia, ulcere focali superficiali e flogosi "a salto" della sierosa;
- controlli intra ed eterospecifici (intestino di cane, intestino e rene di ovino, intestino umano con adenocarcinoma).

I campioni di intestino, prelevati dal tratto digiuno-ileo, erano stati fissati in formalina e inclusi in paraffina, tagliati al microtomo e colorati con EE e ZN; le procedure in situ venivano effettuate per capillarità su sezioni di 5 µm in tre repliche allo scopo di verificarne la ripetibilità. **ISH:** sono state impiegate le sonde oligonucleotidiche **S89** 5'cgctcgggtatggcttcatgtgtgctgtg-dig3' e **S92** 5'cgctcgttgccaccgctgcgagagcaat-dig3', specifiche per un tratto del segmento di inserzione IS900 di MAP. Brevemente: i campioni, sparaffinati, reidratati e permeabilizzati, venivano post-fissati con paraformaldeide e acetilati. La preibridazione (10X SSPE, 200 µg/ml DNA di sperma di salmone, 2X Denhardt's solution, 43% di formamide) era condotta a 43°C per 2 h. L'ibridazione era effettuata o/n (concentrazione delle sonde 5 µg/ml ciascuna). Effettuati i lavaggi post-ibridazione, si procedeva al bloccaggio delle fosfatasi endogene e quindi alla rivelazione con il sistema Anti-Dig-AP-NBT/BCIP e al montaggio dei vetrini in medium acquoso.

ISPCR: le sezioni campione venivano sottoposte ai medesimi trattamenti di permeabilizzazione impiegati in ISH; si procedeva quindi all'amplificazione del DNA target (condizioni: 94°C 5' [93°C 1', 63°C 1', 72°C 3'] x 25 cicli) utilizzando i primer **P90:** 5'-gaagggtgttcggggccgctcgttagg-3' e **P91:** 5'-ggcgttgaggctgatcgccacgtgac-3' (concentrazione 0,5 µM ciascuno nel mix contenente PCR buffer 1X, MgCl₂ 1,5 mM, dNTP 0,2 µM, Taq DNA polimerasi), atti ad amplificare un tratto di 413 bp di IS900 di MAP. Ultimata l'amplificazione, veniva effettuato il lavaggio in PBS delle sezioni e quindi, dalla postfissazione in poi, si procedeva come per l'ISH.

RISULTATI

All'osservazione microscopica, 7 casi di PTBC naturale si rivelavano ascrivibili alla categoria 3b della classificazione di Perez (21,22) o, secondo Clarke e Little (23), presentavano infezione multibacillare, lepromatosa, con numerosi macrofagi e rare cellule giganti in strati "a mosaico" nella lamina propria e nella sottomucosa, fusione dei villi e

consistente ispessimento della parete, positività alla ZN. Un caso naturale e quello sperimentalmente indotto presentavano forte infiltrazione linfocitaria con piccoli granulomi a cellule giganti e costante negatività alla colorazione di ZN (infezione 3c o paucibacillare, tubercoloide). Il quadro microscopico dei 7 casi di Crohn era caratterizzato da infiammazione transmurale, con presenza di noduli granulomatosi ricchi di linfociti, cellule epitelioidi e cellule giganti, negatività alla ZN.

ISH: i controlli intra ed eterospecifici fornivano risultati costantemente negativi (foto n.1).

PTBC: i test consentivano di rilevare rari segnali specifici in sede intracitoplasmatica su macrofagi localizzati nella mucosa nella totalità dei campioni analizzati (foto n.2).

MC: marcature venivano reperite in 5 campioni su 7 (71,5%) negli infiltrati macrofagici soprattutto nella sottomucosa e in aggregati e noduli di cellule linfoidi (foto n.3).

ISPCR: in tutti i campioni di *PTBC* e *MC* analizzati si rilevava un forte incremento del numero e dell'intensità dei segnali ottenuti con l'*ISH*, mentre i preparati controllo si confermavano negativi.

PTBC: forti aree di positività venivano rilevate in sede intracitoplasmatica negli istiociti epitelioidi anche nello strato sottomucoso e in corrispondenza dei vasi linfatici e degli aggregati linfoidi, sia nei campioni multibacillari che in quelli paucibacillari naturalmente o sperimentalmente infetti (foto n.4 e 5).

MC: i 2 campioni risultati negativi in *ISH* rivelavano chiaramente la marcatura delle cellule permissive nei contesti lesivi tipici (positività 100%) (foto n.6).

DISCUSSIONE

I test da noi eseguiti, confermando la loro attendibilità sui campioni di paratuberculosis ovina (24), hanno consentito di ottenere alcune utili informazioni dai preparati di Crohn:

ISH: il grado di positività da noi evidenziato (71,5%) ricalca quanto precedentemente ottenuto da altri gruppi di ricerca.

ISPCR: la costante negatività dei controlli e la positività sul 100% dei campioni indagati ci permettono di fare chiarezza sulla controversa ipotesi micobatterica di Dalziel, potendosi affermare che, in base alle nostre esperienze, *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* è costantemente presente nei casi di Morbo di Crohn.

CONCLUSIONE

La presenza di MAP non può essere considerata casuale in quanto la PCR in situ è dotata, rispetto alla tecnica in fase liquida, di una oggettiva maggiore specificità. Il segnale nel citoplasma dei macrofagi localizzati in specifici contesti lesivi, dimostra l'associazione del batterio con le strutture nelle quali ci si attende di ritrovarlo. Dai nostri risultati emerge con chiarezza una conferma, almeno parziale, dell'ipotesi di Dalziel.

Il presente studio rappresenta un punto di partenza e merita di essere esteso ad una casistica più ampia. Tale esigenza nasce soprattutto dall'analisi comparativa dei risultati ottenuti con l'impiego delle due differenti metodiche; i campioni di Morbo di Crohn sottoposti a *ISPCR* hanno consentito di osservare marcature anche nei preparati che trattati con la semplice ibridazione in situ risultavano negativi. Ciò attesta la maggiore sensibilità della *ISPCR*, metodica che si conferma un potente e prezioso strumento di indagine.

I protocolli impiegati non sono tuttavia in grado di evidenziare esclusivamente i batteri vitali e quindi risulta indispensabile cimentare i campioni con tecniche quali mRNA-*ISH* e l'*IS-RT-PCR* che permetterebbero di rivelare direttamente nel contesto tissutale l'attività trascrittica di MAP. Inoltre, appare necessario procedere allo studio, previa estrazione del DNA, dell'intera sequenza del frammento di inserzione IS900, per escludere la possibilità di amplificazione in situ di frammenti IS900-like, appartenenti a batteri ambientali differenti da MAP.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Dalziel (1913) *BMJ*, 2, 1068-70.
- 2) Burnham et al (1978) *Lancet*, 2, 693-6.
- 3) Chiodini et al (1984) *Dig. Dis. Sci.*, 29(12), 1073-9.
- 4) Haagsma et al (1991) *Acta endosc*; 21, 255-60.
- 5) Wall et al (1993) *J Clin Microbiol*, 31, 1241-5.
- 6) Moss et al (1992) *Gut*, 33,1209-13.
- 7) Dell'Isola et al (1994) *J Inf Dis*, 169, 449-51.
- 8) Suenaga et al (1995) *Am. J. Gastroenterol*, 90, 76-80.
- 9) Gan et al (1997) *Chung Hua Nei Ko Tsa Chih*, 36, 228-30.
- 10) Del Prete et al (1998) *J Microbiol Methods*, 33,105-14;
- 11) Bull et al (2003) *J Clin Microbiol* 41(7), 2915-23.
- 12) Rowbotham et al (1995) *Gut*; 37, 660-7.
- 13) Frank et al (1996) *Modern Path.*, 9, 32-5.
- 14) Al-Shamali et al (1997) *Scand. J. Gastroenterol*, 32, 819-23.
- 15) Kallinowski et al (1998) *Hepato. Gastroenterol*, 45, 1552-8.
- 16) Kanazawa et al (1999) *J Gastroenterol.*, 34, 200-6.
- 17) Hermon-Taylor et al (1998) *Brit Med. J*, 316, 449-53.
- 18) Sechi et al (2001) *J Clin Microbiol* 39(12), 4514-7.
- 19) Naser et al (2002), *Mol Cell Probes*, 16(1), 41-8.
- 20) Sechi et al (2004), *New Microbiol*, 27(1), 75-7.
- 21) Perez et al (1992), *Med. Vet.*, 9, 20-2.
- 22) Perez et al (1996), *J. Comp. Path.*, 114, 107-22.
- 23) Clarke, Little (1996), *J. Comp. Path.*, 114, 419-37.
- 24) Sanna et al (2000), *Eur J Histochem*, 44, 179-84.



Foto 1: ISH: intestino cane. Totale assenza di segnali. 10X

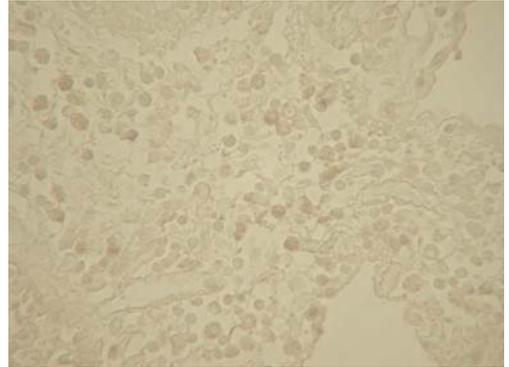


Foto 2: ISH: intestino ovino. PTBC sperimentale. Rari segnali intracitoplasmatici in macrofagi. 40X

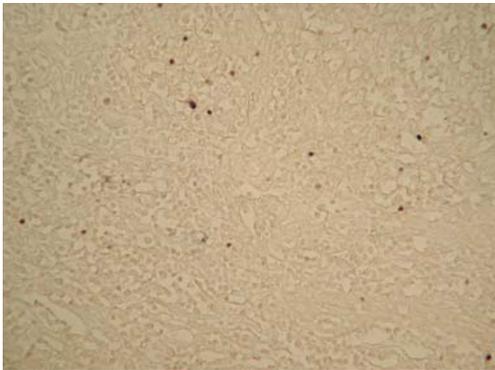


Foto 3: ISH: intestino umano. MC. Rare ma forti e chiare positività su macrofagi. 25X

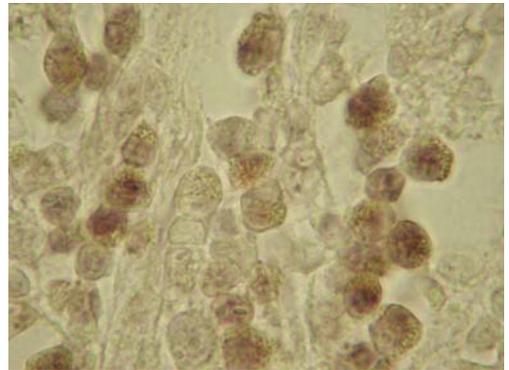


Foto 4: ISPCR: intestino ovino. PTBC naturale multibacillare. Evidente marcatura "granulare" nel citoplasma di macrofagi. 100X

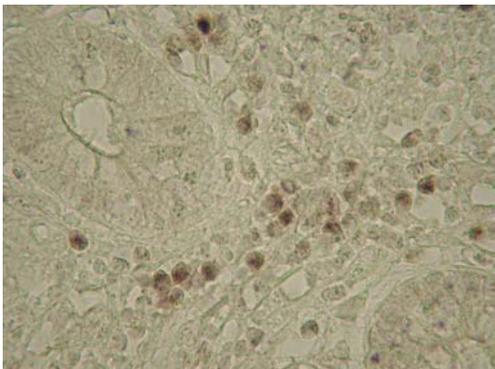


Foto 5: ISPCR: intestino ovino. PTBC naturale paucibacillare. Chiari segnali di ibridazione nei macrofagi dello strato mucoso. 40X

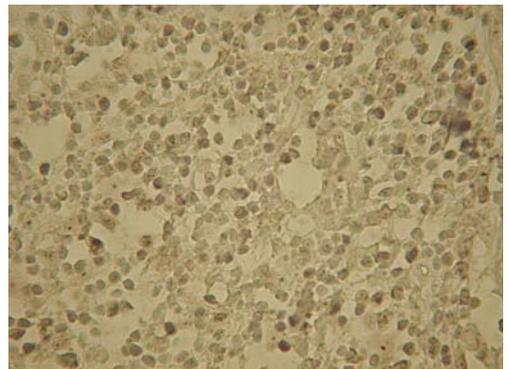


Foto 6: ISPCR: intestino umano. MC. Diffusa e intensa positività. 40X

**MICOBATTERIOSI DA *MYCOBACTERIUM FORTUITUM* NEL BRANZINO IN UN MODELLO
SPERIMENTALE “PER IMMERSIONE”**

Sarli Giuseppe, Zanoni Renato Giulio, Morandi Federico, Fioravanti Maria Letizia, Florio Daniela, Mandrioli Luciana, Brunetti Barbara, *Prearo Marino

*Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale – Bologna; *IZS Torino.*

Al fine di realizzare un modello di infezione sperimentale che permettesse di riprodurre le condizioni di infezione naturale da micobatteri atipici nei pesci, utile per lo studio della patogenesi di queste infezioni, è stato messo a punto un modello “per immersione” sul branzino (*Dicentrarchus labrax*). Due gruppi di branzini di 10g sono stati immersi in sospensioni contenenti 10^2 germi/ml e 10^5 germi/ml di *Mycobacterium fortuitum*; un terzo gruppo è stato utilizzato come controllo negativo. Da ogni gruppo sono stati condotti campionamenti a 16 e 24 ore post infezione (p.i.), quindi giornalmente per i successivi 6 giorni e settimanalmente per 9 settimane. L’esame batteriologico ha permesso di isolare *M. fortuitum* dai soggetti infettati solo dalla quarta settimana p.i. Dati preliminari dell’indagine istologica su 39 soggetti hanno messo in evidenza, in ordine di frequenza decrescente, lesioni granulomatose specifiche in branchie, milza, rene anteriore, fegato e peritoneo. Altri siti quali intestino, cute ed occhio, campionati come le branchie per valutare le possibili vie di entrata, non hanno mostrato lesioni specifiche. Il modello sperimentale realizzato ha permesso di riprodurre la malattia con percentuale di mortalità dei soggetti infetti molto bassa (7,5%) e di rilevare lesioni a livello delle branchie tali da far ritenere questo organo come prima sede di replicazione batterica, nonché verosimile “porta di entrata” per i micobatteri stabulati in acque contaminate.

Parole chiave: micobatteriosi, *Mycobacterium fortuitum*, branzino, infezione sperimentale, immersione.

**EXPERIMENTAL MYCOBACTERIOSIS BY *MYCOBACTERIUM FORTUITUM* IN SEA BASS IN AN
“IMMERSION” MODEL.**

An experimental model obtained “by immersion” of piscine mycobacteriosis in the sea bass by *M. fortuitum* was employed for studies on the pathogenesis of the disease. Two groups of sea bass exposed to 10^2 or 10^5 bacteria/ml and a 3rd negative control group underwent bacteriology and histopathology after 16 and 24 p.i. hrs, 2-7 p.i. days and once a week for 9 weeks. Micobacteria were isolated from the infected fish since the IV p.i. week, while preliminary histological investigation on 39 subjects revealed, since the I p.i. week, granulomata positive to Ziehl-Neelsen and to immunohistochemistry by anti-*Mycobacterium bovis* antibody (Dako), in decreasing frequency in gills, spleen, anterior kidney, liver and peritoneum. Apart from gills, any other organ such as anterior and posterior tract of the digestive system, eyes, skin at the level of lateral line, sampled to ascertain the site of primary replication, showed specific lesions. The model employed in this study permitted to reproduce the disease and showed the gills as a likely portal of entry of mycobacteria in fish living in contaminated waters.

Key words: mycobacteriosis, *Mycobacterium fortuitum*, sea bass, experimental infection, immersion.

INTRODUZIONE

In ittiopatologia il termine “Micobatteriosi” indica un complesso di malattie sistemiche ad andamento cronico sostenute da batteri appartenenti al genere *Mycobacterium*, riscontrate principalmente nei pesci d’acquario, ma anche nei selvatici ed in quelli allevati per consumo alimentare. Queste patologie, nel loro aspetto tipico, sono caratterizzate da deperimento cronico con perdita di peso e presenza di lesioni granulomatose disseminate negli organi interni in particolare nella milza, nel rene e nel fegato dei soggetti colpiti. Le micobatteriosi ittiche sono oggetto di studio sia per il loro riscontro nell’allevamento intensivo, sia per il loro potenziale zoonosico (Greco e Bozzetta, 1997; Puttinaowarat, 1999). In aggiunta, la malattia viene considerata non trattabile una volta entrata in allevamento essendo quindi causa di gravi risvolti economici per l’allevatore (Francio-Floyd e Yanong, 1999; dos Santos e coll., 2002).

I micobatteri più frequentemente isolati da pesci marini e dulciacquicoli sono *M. marinum*, *M. fortuitum* e *M. chelonae* (Gauthier e coll., 2003). Sebbene le micobatteriosi ittiche siano conosciute da tempo la patogenesi di queste infezioni è ancora in parte sconosciuta. Esistono studi di infezione sperimentali “per inoculazione” nel pesce rosso (Talaat e coll., 1998; Talaat e coll., 1999) e nel branzino (Colorni e coll. 1998; Sarli e coll., 2003), ma il limite di questi modelli è che non riproducono l’infezione naturale. La finalità di questa ricerca è stata quella di mettere a punto un modello di

infezione “per immersione” nel branzino utilizzando diversi dosaggi di *M. fortuitum* per individuare la possibile via di entrata dei micobatteri nell’ospite ed apportare quindi un contributo allo studio della patogenesi di questa malattia.

MATERIALI E METODI

Per l’esecuzione della prova sono stati impiegati 145 branzini (*Dicentrarchus labrax*) di circa 10g. Prima dell’inizio della sperimentazione su 25 soggetti sono state condotte analisi finalizzate ad escludere infezioni batteriche e/o parassitarie. I branzini rimanenti sono stati quindi divisi in 3 gruppi da 40 soggetti. Due gruppi sono stati infettati mediante immersione per due ore in una sospensione di *Mycobacterium fortuitum* contenente rispettivamente 10^2 germi/ml e 10^5 germi/ml. Il terzo gruppo è stato utilizzato come gruppo di controllo negativo. Due soggetti per ogni gruppo venivano soppressi previa anestesia con MS222 a 16 e 24 ore p.i., quindi giornalmente per i successivi 6 giorni e settimanalmente per 9 settimane. Prima della loro fissazione *in toto* in formalina di Carson, in entrambi i soggetti veniva praticata l’apertura della cavità addominale e, da uno di essi, si provvedeva ad asportare in asepsi una porzione della milza e del fegato per effettuare l’isolamento del ceppo batterico impiegato per l’infezione. Per un preliminare esame istologico da 39 soggetti venivano allestite sezioni istologiche seriate colorate con ematossilina-eosina e Ziehl-Neelsen (ZN) da: cute (linea laterale anteriormente alla pinna caudale), branchie, occhio, tratto anteriore e posteriore dell’intestino, fegato, rene anteriore, peritoneo e milza. Per l’indagine immunoistochimica (IHC) è stato impiegato un anticorpo policlonale anti-*Mycobacterium bovis* (Dako) diluito 1:3000 con rivelazione mediante sistema Kit LSAB perossidasi (Dako).

RISULTATI

Mycobacterium fortuitum è stato isolato dai soggetti di entrambi i gruppi infettati dalla 4° settimana p.i. in poi. Il quadro istologico rilevato nei due gruppi di branzini infettati con diverso dosaggio ha presentato un andamento sovrapponibile. Lesioni istologiche riferibili a micobatteriosi sono state evidenziate a partire dalla prima settimana p.i. ed in ordine di frequenza decrescente a livello di branchie, milza, rene anteriore, fegato e peritoneo (figura 1).

La lesione tipica riscontrata nella prima settimana p.i. era un granuloma, da singolo e focale a multiplo e confluyente, inizialmente caratterizzato dall’accumulo di aggregati nodulari di cellule epitelioidi e rari linfociti alla periferia (figura 2a). Nella seconda settimana p.i., con il progredire dell’infezione, si riscontravano picnosi e carioressi in singole cellule al centro della lesione la quale tendeva, dopo la terza settimana p.i., ad evolvere in necrosi caseosa (figura 3a, b) con presenza di materiale eosinofilo amorfo circondato, oltre che da cellule infiammatorie, anche da un sottile vallo connettivale. In alcuni casi i granulomi tendevano a confluire con quelli adiacenti. Nei granulomi iniziali, in cui non si evidenziava necrosi, i bacilli acido-resistenti risultavano difficilmente evidenziabili con ZN (figura 2b), mentre una elevata positività specifica veniva riscontrata con IHC (figure 2c e 5). Nelle lesioni avanzate con necrosi caseosa sia ZN che IHC evidenziavano una forte positività per micobatteri (figura 3b, c).

In 15 (38,46%) dei 39 soggetti osservati le branchie mostravano lesioni così distribuite: in 10 casi alla base delle lamelle e nello stroma delle stesse (figure 4 e 6), in 1 solo caso nello stroma della lamella primaria ed in 4 casi solo alla loro base. In quest’ultima localizzazione le lesioni erano tipicamente granulomatose, mentre nello stroma vi era un infiltrato diffuso di macrofagi epitelioidi senza una vera e propria organizzazione nodulare. In alcuni casi erano riscontrabili lesioni focali di branchite a livello di lamelle secondarie, con iperplasia delle cellule epiteliali, monociti e rari acido-resistenti a livello intracellulare. In particolare, limitando l’osservazione solo ai 23 soggetti campionati nelle prime tre settimane, la percentuale delle lesioni branchiali aumentava sul totale dei branzini esaminati passando dal 38,46% al 43,48% (10 soggetti con lesioni, di cui 6 sia alla base che nello stroma della lamella primaria e 4 solo alla base) (figura 6).

Nella milza in 15 casi su 39 erano presenti iperplasia dei centri melanomacrofagici (6 casi) e/o lesioni granulomatose (10 casi); nel rene anteriore vi era iperplasia dei centri melanomacrofagici (1 caso) o granulomi (7 casi) (figura 1). Nel fegato sono stati osservati 5 soggetti con epatite granulomatosa ed infine, su 5 casi di reazione peritoneale, due casi di peritonite granulomatosa, mentre nei restanti si rilevava peritonite acuta iniziale. Altri siti, quali tratto anteriore e posteriore dell’intestino, cute ed occhio non hanno mostrato lesioni specifiche.

DISCUSSIONE

La riproduzione della malattia nei soggetti “esposti”, la bassa percentuale di mortalità nei gruppi infettati (7,5%), nonché la precoce identificazione su base istopatologica della malattia permettono di riconoscere nel modello “per immersione”, per la prima volta applicato alle micobatteriosi ittiche, un valido mezzo per lo studio della patogenesi di queste infezioni nei pesci. Sulla base delle osservazioni istologiche, seppure preliminari, condotte nel presente studio, le branchie sembrano rappresentare l’organo primariamente coinvolto quale porta d’ingresso e precoce moltiplicazione dei micobatteri, anche alla luce del mancato rilievo di lesioni tipiche in altri organi campionati quali potenziali vie di ingresso. Lesioni branchiali erano state riscontrate, sempre nel branzino, anche nel corso di un nostro precedente

modello sperimentale condotto per inoculazione intraperitoneale con lo stesso ceppo di *M. fortuitum* (Sarli e coll., 2003). In tale modello sperimentale la peritonite granulomatosa si era rivelata la lesione più frequentemente osservata, mentre le lesioni branchiali erano state rilevate solo in 6 (17,64%) dei 34 soggetti campionati nelle prime tre settimane p.i. Di queste lesioni, 4 erano localizzate solo alla base delle lamelle primarie e 2 sia alla base che nello stroma delle stesse (dati non pubblicati). La percentuale di soggetti con lesioni branchiali è risultato più elevato nel presente modello. Va inoltre rilevato come le lesioni branchiali siano risultate più frequenti alla base delle lamelle (verosimilmente per diffusione ematogena) nel modello di inoculazione intraperitoneale, mentre si sono registrate più frequenti nello stroma delle lamelle primarie (verosimilmente per esposizione locale) nel modello per immersione.

CONCLUSIONI

Alla luce dei risultati ottenuti si sottolinea come questo studio, che ha utilizzato un modello sperimentale innovativo, individui nelle branchie la principale porta di entrata di *M. fortuitum* in questa specie ittica allorché il contagio avvenga tramite acqua contaminata.

BIBLIOGRAFIA

- Colorni A., Avtalion R., Knibb W., Berger E., Colorni B., Timan B. (1998): Histopathology of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) experimentally infected with *Mycobacterium marinum* and treated with streptomycin and garlic (*Allium sativum*) extract. *Aquaculture*, 160: 1-17.
- Gauthier D.T., Rhodes M.W., Vgelbein W.K., Kator H., Ottinger C.A. (2003): Experimental mycobacteriosis in striped bass *Morone saxatilis*. *Dis. Aquat. Org.* 54:105-117.
- Greco A., Bozzetta E. (1997): Tuberculosis ittica e salute umana. *O&DV*, 12: 39-43.
- Puttinaowarat S. (1999): Mycobacteriosis: a chronic disease threatening fish and man. *AAHRI Newsletter* article, 8 (2). http://www.fisheries.go.th/aahri/Health_new/AAHRI/AAHRI/Topics/Newsletter/art40.htm
- dos Santos N.M.S., do Vale A., Sousa M.J., Silva M.T. (2002): Mycobacterial infection in farmed turbot *Scophthalmus maximus*. *Dis. Aquat. Org.* 52: 87-91.
- Sarli G., Zanoni R.G., Preziosi R., Florio D., Prearo M. (2003): Micobatteriosi ittica da *Mycobacterium fortuitum* nel branzino (*Dicentrarchus labrax*). *Atti del XXI Convegno Nazionale APIV*, Grugliasco (TO) 6-7 giugno, pp 94-97. (<http://www.aipvet.it/APIVMeetings/2003ATTIPIV/ATTIPIV2003.htm#record26>).
- Talaat A.M., Reimschuessel R., Wasserman S.S., Trucksis M. (1998): Goldfish *Carassius auratus*, a novel animal model for the study of *Mycobacterium marinum* pathogenesis. *Infect. Immun.*, 66(6): 2938-2942.
- Talaat A.M., Trucksis M., Kane A.S., Reimschuessel R. (1999): Pathogenicity of *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium smegmatis* to goldfish, *Carassius auratus*. *Vet. Microbiol.* 66: 151-164.

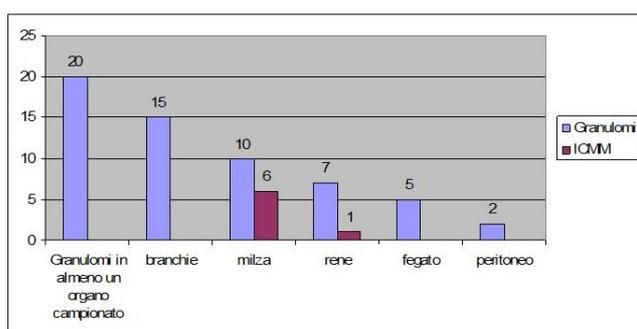


Fig.1 : Il grafico mostra la distribuzione e il numero di casi con lesioni granulomatose nei diversi organi. ICMM: iperplasia dei centri melanomacrofagici.

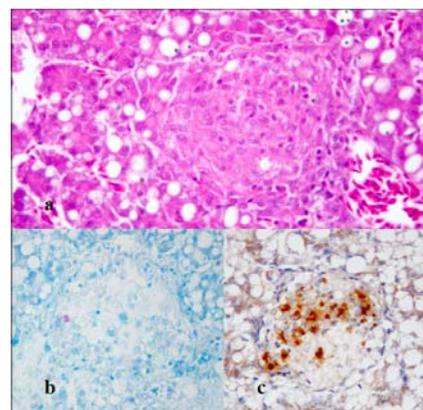


Fig.2 : Branzino, fegato. Granulomi iniziali senza necrosi centrale: "a" E&E, 20x; "b" lo Z-N mostra solo pochi batteri acido-resistenti, 63x; "c" il metodo immunocitochimico evidenzia nello stesso granuloma una maggiore positività, 40x.

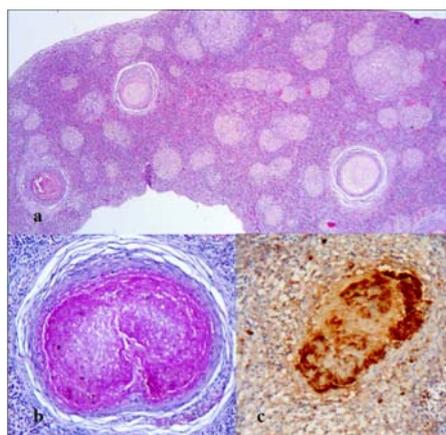


Fig.3: Branzino, milza. Granulomi multipli con vasta area di necrosi centrale e positività marcata sia con lo Z-N (b, 20x), che IHC (c, 20x); “a”, E&E, 5x.



Fig. 4: Branzino, branchie. Granulomi sono evidenti sia alla base (frecche corte) che nello stroma della lamella primaria (frecche lunghe) (a); il riquadro (b) mostra una lesione più diffusa alla base delle branchie. E&E, 10x.

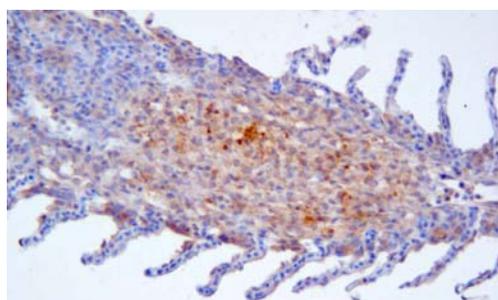


Fig. 5: Branzino, branchie. Il colore bruno del metodo di rilevazione immunostochimico evidenzia la positività specifica delle lesioni branchiali anche nelle prime fasi di infezione, 40x.

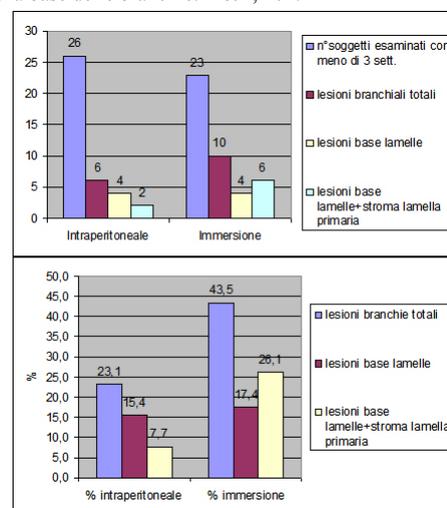


Fig. 6: I grafici mettono a confronto la diversa distribuzione (numerica e percentuale) delle lesioni branchiali in due diversi modelli di infezione sperimentale, quello “per immersione” oggetto di questa presentazione ed uno precedente (Sarli et al., 2003) con inoculazione intraperitoneale.

INDAGINI IMMUNOISTOCHEMICHE E BIOMOLECOLARI PER L'EVIDENZIAMENTO DI RETROVIRUS JSRV-CORRELATI IN CARCINOMI BRONCHIOLO-ALVEOLARI DELL'UOMO

¹Rocca Stefano, ¹Sanna Maria Paola, ¹Farigu Serafina, ¹Pirino Salvatore, ²Cossu Antonio, ³Palmieri Giuseppe, ²Lissia Amelia, ¹Leoni Antonio.

¹Istituto di Patologia Generale, Anatomia Patologica e Clinica Ostetrico-Chirurgica Veterinaria, ²Istituto di Anatomia e Istologia Patologica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Sassari, ³CNR Sassari

Il carcinoma bronchiolo-alveolare è stato descritto nell'uomo e in molte specie animali, in particolare nei bovini, nella pecora, nei carnivori domestici e nella capra. Negli ovini, tale neoplasia, è nota sotto il nome di adenomatosi polmonare ovina (OPA), patologia sostenuta da un retrovirus di tipo D, conosciuto con il nome jaagsiekte sheep retrovirus (JSRV), il quale determina trasformazione neoplastica nei pneumociti di tipo II e nelle cellule di Clara. Nell'uomo una patologia neoplastica analoga è conosciuta con il nome di carcinoma bronchiolo-alveolare (BAC), le cui caratteristiche istomorfologiche sono in buona misura sovrapponibili a OPA. Tale malattia compare sottoforma di un adenocarcinoma ben differenziato, spesso non associato a soggetti fumatori. Alcuni autori hanno cercato in passato di associare la neoplasia nell'uomo a quella della pecora, cercando di evidenziare proteine capsidiche o sequenze retrovirali in qualche modo correlate con il virus dell'OPA del quale si conosce la sequenza completa. I risultati riportati in letteratura sono contrastanti e non danno una risposta chiara e definitiva sulla tematica. Nel presente lavoro è stata eseguita un'indagine su dieci campioni di BAC, e su un controllo negativo proveniente da tessuto polmonare umano senza patologia neoplastica in atto. Come controlli positivi sono stati utilizzati campioni di polmone ovino affetto da OPA. Tutti i tessuti erano stati fissati in formalina e inclusi in paraffina. Sui campioni si è proceduto ad esame istopatologico, estrazione del DNA, PCR in fase liquida e sequenza degli amplificati, indagine immunocitochimica e ibridazione in situ. La ricerca ha dato esito positivo nell'ambito di tutte le metodiche utilizzate: i risultati sono stati confermati dalla sequenza degli amplificati. I controlli positivi di ovino e il controllo negativo umano, sono risultati tali.

Parole chiave: adenocarcinoma bronchioloalveolare, adenomatosi polmonare ovina, ibridazione in situ, immunocitochimica.

IMMUNOHISTOCHEMISTRY AND BIOMOLECULAR INVESTIGATION FOR THE EVIDENCE OF JSRV-LIKE RETROVIRUS IN HUMAN BRONCHIOLO-ALVEOLAR CARCINOMAS.

The bronchioloalveolar adenocarcinoma was described in several species (human, bovine, ovine and domestic carnivores). Ovine pulmonary adenocarcinoma (OPA) or pulmonary adenomatosis is a contagious carcinoma of sheep caused by an exogenous type D retrovirus denominated also jaagsiekte sheep retrovirus (JSRV). JSRV is responsible of the neoplastic transformation of type II pneumocytes and Clara cells. The human bronchioloalveolar adenocarcinoma (BAC) have histo-morphological features much similar to OPA. We report the study about ten BAC cases and one negative human control (lung). DNA extraction, PCR, sequencing of amplified product, immunohistochemistry and in-situ hybridization were performed on all paraffin-embedded samples. Our results demonstrated the presence of JSRV-like sequences in all cases of human bronchiolo-alveolar carcinoma.

Key word: bronchioloalveolar adenocarcinoma, sheep pulmonary adenomatosis, in-situ hybridization, immunohistochemistry.

INTRODUZIONE

Il carcinoma bronchiolo-alveolare dell'uomo è un tipo particolare di adenocarcinoma polmonare che colpisce i pneumociti di tipo II e le cellule di Clara. Tale patologia si manifesta con una serie di aspetti unici che la rendono facilmente distinguibile dagli altri tumori polmonari, compreso l'adenocarcinoma, e in modo particolare per la localizzazione multifocale nell'ambito della periferia del parenchima, l'assenza di lesioni associate ai bronchi e la diffusione intralveolare senza apparente scomparsa dello spazio respiratorio. Istologicamente BAC viene classificato secondo tre forme, mucinosa, non mucinosa e mista. Tale patologia, in passato ritenuta piuttosto rara, attualmente viene segnalata sempre più frequentemente ed in genere è associata a soggetti non fumatori, donne e bambini. L'aspetto istologico e ultrastrutturale osservato su BAC è assolutamente sovrapponibile a quello che comunemente si osserva

nell'adenomatosi delle pecore, causata dal virus JSRV, retrovirus esogeno (JRSVes) di tipo D (Martin *et al.*, 1976; Sharp and Herring, 1983; York *et al.*, 1992; Palmarini *et al.*, 1995, 1996a, 1999a; Baire *et al.*, 1996). È noto inoltre, che il genoma delle pecore possiede circa 15-20 copie di sequenze endogene retrovirali trascrizionalmente attive strettamente correlate con JRSVes (York *et al.*, 1992; Hecht *et al.*, 1994). Attualmente l'associazione tra neoplasia e virus è stata confermata solo nella pecora e nel muflone, mentre nell'uomo il quadro eziopatologico non è stato ancora chiarito. Studi immunohistochimici, eseguiti utilizzando un siero policlonale contro la proteina capsidica di JSRV, hanno evidenziato una positività per JSRV sul 30% di BAC e sul 26% di adenocarcinomi tipici (De Las Heras *et al.*, 2000). Tali risultati appaiono in chiaro contrasto con più recenti studi biomolecolari per la ricerca del DNA e dell'RNA virale (Yousem *et al.*, 2001; Hiatt *et al.*, 2002), che non hanno confermato i dati presentati nei precedenti lavori. Recenti acquisizioni hanno però aperto nuove prospettive nello studio di BAC e sulle implicazioni che JSRV avrebbe a riguardo; su una indagine condotta su campioni di sangue di soggetti emofilici, HIV positivi e con patologia neoplastica polmonare residenti in Africa e in Europa, è stato infatti possibile evidenziare sequenze JSRV-like su 23 di 103 campioni totali (V.A. Morozov *et al.*, 2004).

Allo scopo di apportare un ulteriore contributo sulla tematica, abbiamo condotto un'indagine preliminare su campioni d'archivio di BAC, provenienti dall'Istituto di Anatomia e Istologia Patologica della Facoltà di Medicina di Sassari. Su tali campioni sono state condotte indagini immunohistochimiche, PCR in fase liquida e indagini di ibridazione in situ.

MATERIALI E METODI

Campioni istologici - Oggetto della nostra indagine sono stati n°10 campioni di BAC già inclusi in paraffina e precedentemente fissati in formalina; i prelievi provenivano da reperti autoptici di soggetti deceduti o da biopsie eseguite in pazienti sottoposti a intervento chirurgico e tuttora in vita. Come controllo negativo veniva utilizzato un campione di polmone umano proveniente da un soggetto senza patologia neoplastica. L'anamnesi dei pazienti e la rispettiva diagnosi istopatologica era stata eseguita presso il laboratorio di istopatologica della Facoltà di Medicina e Chirurgia. Come controllo positivo venivano impiegati 2 campioni di archivio di polmone ovino con Adenomatosi Polmonare confermata mediante PCR in fase liquida e indagini in situ pregresse. Come controlli intra ed eterospecifici venivano utilizzati rispettivamente polmone di agnello e di suino.

Immunohistochimica - Le sezioni per immunohistochimica, sezionate ad uno spessore di 3 µm, sono state montate su vetrini pretrattati con 3-aminopropyl-triethoxylane. Dopo lo sparaffinamento si è proceduto allo smascheramento degli antigeni con due trattamenti mediante forno a microonde a 750W per 4' ciascuno in tampone citrato pH 6.0, evitando l'over-riscaldamento del tampone stesso. Le sezioni sono state poi incubate o/n con il siero specifico policlonale, prodotto in coniglio, diretto contro la proteina capsidica di JSRV. Per la reazione di rivelazione si è usato il kit Immunoperoxidase LAB/Probe Kit Streptavidina-biotina che utilizza come cromogeno la diaminobenzidina.

Estrazione del DNA - L'estrazione del DNA provirale è stata eseguita a partire da sezioni di 5 µm ciascuna per un peso totale di tessuto di circa 50 mg. Il tessuto veniva sottoposto a sparaffinamento con tre passaggi in xilolo a 60°C e due lavaggi in alcool assoluto. Dopo essiccamento a 50°C si procedeva alla digestione o/n con buffer di lisi (TrisHCl 50mM, EDTA 20 mM, SDS 1%, β-mercaptoetanolo 1%) e proteinasi K (300µg/ml); successivamente i campioni apparivano limpidi e si procedeva con la precipitazione del DNA mediante NaCl 5M. I pellets venivano lavati con alcool assoluto e al 70% ed essiccati all'aria. Dopo aver risospeso il DNA in acqua sterile, si eseguiva la lettura spettrofotometrica per valutare la concentrazione dei campioni da testare in PCR.

PCR in fase liquida - Per la PCR in fase liquida sono stati utilizzati 500 ng di DNA totale per ciascuna reazione (50µl); la metodica prevedeva l'utilizzo dei primers P1 (TGGGAGCTCTTTGGCAAAGCC) e P3 (CACCGATTTTTACACAATCACCGG) che si inseriscono nella regione U3 del genoma virale discriminando le sequenze esogeno-specifiche di JSRV e amplificando una regione a cavallo tra il gene *gag* e la regione *LTR* di 179 bp. Per migliore la sensibilità della reazione di amplificazione si procedeva con una emi-nested utilizzando la coppia di primer P1 e P6 (TGATATTTCTGTGAAGCAGTGCC) che a loro volta amplificano un frammento di 133 bp interno al precedente (Palmarini *et al.*, 1996). Il protocollo di amplificazione prevedeva per la PCR1 un ciclo a 94°C, 35 cicli rispettivamente a 94°C per 30", 59°C per 1' e a 72°C per 1', ed infine un'extension finale a 72°C per 3'. Il protocollo di amplificazione per la PCR2 era invece così disegnato: un ciclo a 94°C, 35 cicli rispettivamente a 94°C per 30", 57°C per 1' e a 72°C per 1', ed infine una extension finale a 72°C per 3'. La master mix prevedeva per entrambe le PCR la stessa concentrazione dei reagenti (buffer Taq gold 10X, 4 mM MgCl₂, 10 µM di ciascun primer, 200 µM di dNTP e 2-5 U di Taq gold) fatto salvo che per la PCR 2 si utilizzavano 2 µl della PCR 1. I prodotti di PCR venivano poi colorati con bromuro di etidio ed esaminati in elettroforesi su gel di agarosio al 2%.

Ibridazione in situ - *Sparaffinamento e reidratazione a cielo aperto*: xilolo 15' (2 volte), alcool 100° assoluto 10'(1 volta), alcool 95° assoluto 10'(1 volta), alcool 70° assoluto 5'(1 volta) alcool 50° assoluto 5'(1 volta), PBS 5'. *Permeabilizzazione*: HCl 0,2 N 15', PBS 1', Triton X-100 0,3% in PBS 15', PBS 1', Protease K 10 µg/ml in PBS 5' 37° C, PBS 5'(2 volte), TRIS-HCl 10 mM pH 8,3 5'(2 volte), PBS 5'(2 volte). *Postfissazione*: paraformaldeide 4% in PBS

2', PBS 1', H₂O milliq 1'. *Acetilazione*: TEA (Trietanolamina 0,1 M e Anidride Acetica 0,25%) 15', PBS 5'(2 volte). *Preibridazione*: 50% Hybridization Solution 2X (SSPE 10X; DNA sperma salmone 200 µg/ml; Denhardt's solution 2X.) 49% formamide 2h 38°C. *Ibridazione*: 50% Hybridization Solution 2X /49% formamide sonda **P IV** 7316 5'-DIG GGCCTGCTTCACAGAAATATCAGGAAATCTGATT-3' 1 µM (concentrazione finale), sonda **P V** 7280 5'-DIGTTTTTAAAAGCTCTTAAGGCTCGGATGTTTGCT T-3' 1 µM (concentrazione finale). *Denaturazione* 8' 98°C. *Ibridazione* 38°C O/N. Di seguito si procedeva con i lavaggi, il bloccaggio di fosfatasi endogene, la rivelazione con il sistema immunoenzimatico digoxigenina-NBT/BCIP e infine con il montaggio dei vetrini in medium acquoso.

RISULTATI

Immunoistochimica – Cinque campioni di BAC mostravano, nel citoplasma d'epiteli trasformati e di macrofagi, chiari segnali di positività verso la proteina capsidica virale. Altri 2 campioni manifestavano segnali di positività, difficilmente interpretabili perché presenti anche su target cellulari non coinvolti dalla neoplasia, a livello interstiziale. Tre campioni risultavano negativi. Nessun segnale veniva rilevato nei controlli negativi, mentre i campioni di OPA mostravano intensa positività a livello degli epitelii trasformati. (Fig. 1).

PCR in fase liquida – La PCR in fase liquida ha dato risultati positivi su tutti i campioni di DNA estratti da tessuti affetti da BAC e sui controlli di OPA. Gli amplificati apparivano privi di bande aspecifiche e, se pur di intensità differente da campione a campione, del peso molecolare atteso. I controlli negativi non avevano nessun tipo di banda. Per confermare il risultato sono stati inviati al sequenziamento sia i prodotti di PCR risultati positivi - i quali hanno confermato la sequenza nucleotidica già descritta in banca dati - sia i prodotti di PCR dei controlli risultati negativi, per verificare la presenza di amplificati da inquinamento non visualizzabili in elettroforesi perché al di sotto del potere risolutivo del gel di agarosio.

Ibridazione in situ – Tutti i campioni esaminati (5) presentavano un chiaro segnale intracellulare a livello delle aree dove era presente la neoplasia; non è stato possibile evidenziare positività a livello dei macrofagi. I controlli confermavano i risultati attesi.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I risultati della nostra indagine, sebbene del tutto provvisori, sembrano confermare quelli ottenuti dai pochi AA che hanno ipotizzato un ruolo attivo di retrovirus JSRV-like nella patogenesi del carcinoma bronchiolo-alveolare dell'uomo. Il pattern immunoistochimico è risultato analogo a quello osservabile in OPA, infatti nel contesto di BAC è stato evidenziato un antigene correlato a JSRV. Tali osservazioni sono stati confermati dai risultati ottenuti mediante le indagini biomolecolari in fase liquida e in situ. In modo particolare la PCR in fase liquida si è dimostrata sensibile e specifica, in quanto il sequenziamento dei tratti amplificati ha confermato le sequenze presenti in banca dati. Non è però chiaro, al momento, se tale antigene è prodotto dall'espressione di sequenze retrovirali endogene integrate nel genoma umano, così come avviene nell'ovino (Sanna E. *et al.*, 2002; Palmarini M. *et al.*, 2003), oppure dall'attività di un retrovirus esogeno JSRV-like. Tali dubbi, unitamente alla scarsità e alla discordanza dei pareri espressi dagli studiosi che hanno operato sull'argomento, impongono un ulteriore approfondimento delle indagini. Tra gli obiettivi che si pone il nostro gruppo di ricerca vi sono un ampliamento della casistica, per poter dare una significatività statistica ai risultati. A tale riguardo sarà importante indagare sia su ulteriori campioni di BAC, che su un adeguato numero di polmoni non affetti da patologia neoplastica. Tutto ciò per verificare se anche nell'uomo esistano sequenze retrovirali endogene integrate che, possano in qualche modo svolgere un ruolo nella patogenesi del carcinoma bronchioloalveolare, così come avviene nell'ovino (immunosoppressione?). Contestualmente a quanto detto in precedenza, sarà indispensabile l'impiego di ulteriori e più sensibili metodiche di indagine. Infatti occorrerà verificare l'eventuale espressione virale a livello cellulare; ovvero la ricerca di RNA messaggeri (RT-PCR) che possano in qualche modo indicare una attività trascrittivica virale, nell'ambito di una patologia tumorale riconducibile a BAC.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Barsky SH, Cameron R, Osann KE, Tomita D, Holmes EC. (1994), *Cancer* 73: 1163-70.
- 2) De Lamballerie X, Chapel F, Vignoli C, Zandotti C. (1994), *J Clin Pathol*, 47: 466-467.
- 3) De Lamballerie X, Zandotti C, Vignoli C, Bollet C, De Micco P. (1992), *Res Microbiol* 143: 785-790.
- 4) Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. (1999), *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor Ed, NY, 1982.
- 5) Palmarini M, Sharp JM, De las Heras M, Fan H.. (1999), *J Virol* 73: 6964-6972.
- 6) Palmarini M, Fan H, Sharp JM. (1997), *Trends Microbiol* 5(12): 478-483.
- 7) Palmarini M, Holland MJ, Cousens C, Dalziel RG, Sharp JM.. (1996), *J Gen Virol* 77: 2991-2998.
- 8) Parker SL, Tong T, Bolden S, Wingo PA. (1997) *Cancer J Clin* 47:5-27.
- 9) Sanger F, Nicklen S, Coulson AR.. (1992), *Biotechnology* 24: 104-108.
- 10) Sepp R, Szabò I, Uda H, Sakamoto H.. (1994), *J Clin Pathol* 47: 318-323.
- 11) Morozov VA, Lagaye S, Lower J, Lower R.. (2004), *Virology*;327(2):162-8.
- 12) Mornex JF, Thivolet F,

De las Heras M, Leroux C. (2003), *Curr Top Microbiol Immunol.*;275:225-48. **13**) Hiatt KM, Highsmith WE.. (2002), *Hum Pathol.* Jun;33(6):680. **14**) Yousem SA, Finkelstein SD, Swalsky PA, Bakker A, Ohori NP. (2001), *Hum Pathol.*;32(10):1039-42. **15**) De las Heras M, Barsky SH, Hasleton P, Wagner M, Larson E, Egan J, Ortin A, Gimenez-Mas JA, Palmarini M, Sharp JM.. (2000), *Eur Respir J*;16(2):330-2. **16**) Sanna E, Sanna MP, Loddo C, Sanna L, Mura M, Cadelano T, Leoni A. (2002), *Eur J Histochem.*;46(3):273-80.

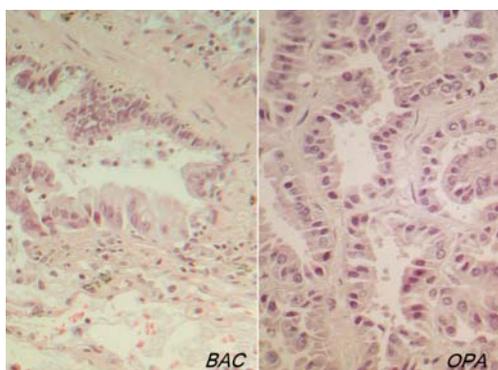


Foto 1: EE: polmone uomo sx, ovino dx. Totale sovrapponibilità delle lesioni neoplastiche. 20X

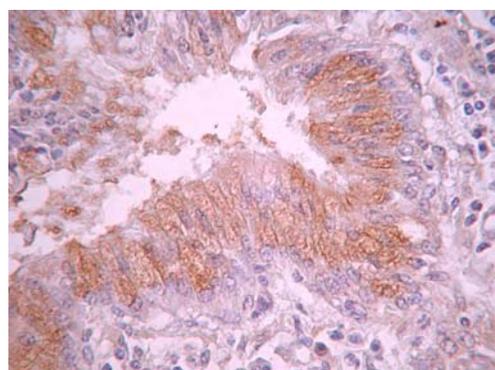


Foto 2: IHC anti-proteina capsidica. polmone ovino OPA. Evidente positività citoplasmatica a livello degli epitelii trasformati. 40X

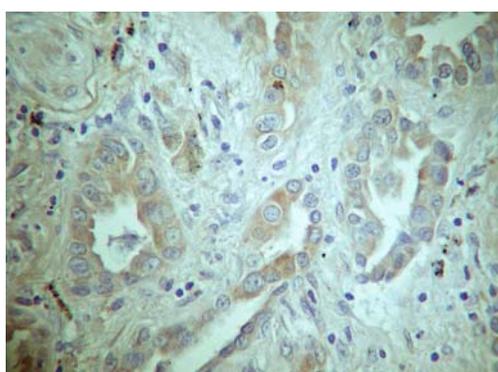


Foto 3: IHC anti-proteina capsidica. polmone uom BAC. Positività citoplasmatica a livello degli epitelii trasformati. 40X

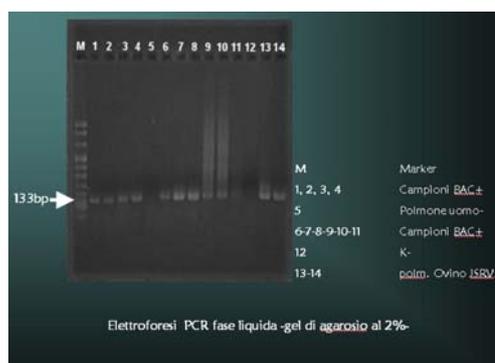


Foto 4: Corsa elettroforetica della PCR in fase liquida.

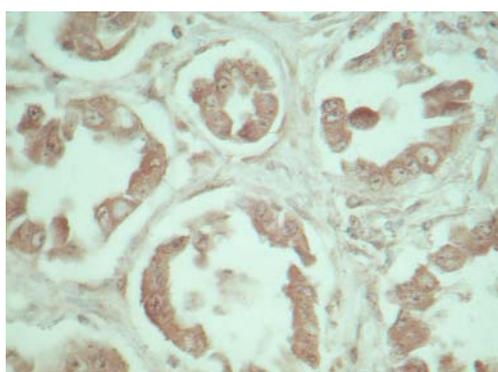


Foto 5: ISH: polmone ovino OPA. Positività a livello degli epitelii trasformati. 40X



Foto 6: ISH: polmone uomo BAC. Positività lungo gli epitelii trasformati. 10X

POTENZIAMENTO DELL'ATTIVITÀ DI NF-kB IN INTESTINI DI PECORE AFFETTE DA PARATUBERCOLOSI: POSSIBILE IMPLICAZIONE DI UN GENE NOD2-LIKE MODIFICATO NELL'EVOLUZIONE DELLA PATOLOGIA INTESTINALE

Rossi Giacomo¹, Tarantino Chiara², Gregori Michela², Bernardini Marialina³, Taccini Ennio²

1 Dipartimento di scienze veterinarie, Università di Camerino

2 Dipartimento di Patologia animale, Profilassi ed Igiene degli Alimenti, università - Pisa.

3 Dipartimento di Biologia Cellulare e Dello Sviluppo, Università La Sapienza - Roma

Nell'uomo e in alcuni modelli animali varianti del gene Nod2 e della relativa proteina, che agisce come sensore citoplasmatico del muramyl dipeptide (MDP) di origine batterica, aumentano la suscettibilità a patogeni intestinali anche di tipo commensale. Queste varianti del gene risultano modificate nell'attivazione del fattore nucleare kB (NF-kB) determinano una risposta infiammatoria smodata ed autoaggravante. Al fine di valutare il ruolo di NF-kB nella regolazione della flogosi intestinale in corso di paratubercolosi, sono state esaminate 18 pecore, 4 animali di controllo e 14 animali sierologicamente e microbiologicamente positivi, con quadri clinici e patologici differenti. Alla valutazione immunohistochimica dell'espressione di NF-kB si è associata la valutazione, eseguita tramite RT-PCR, dei livelli di IL-1 beta ed IL-6 espressi nel tratto ileale terminale, ove sono state ritrovate costantemente le lesioni più gravi. Tramite tecnica TUNEL si è valutata infine la percentuale di nuclei apoptotici delle cellule macrofagiche VPM32+ nel tratto enterico esaminato. I risultati mostrano una maggiore espressione del fattore nucleare attivato NF-kB nelle cellule della mucosa di pecore con forma enterica multibacillare o lepromatosa, rispetto a quelle con lesioni paucibacillari/infiltrative di tipo microgranulomatoso (tubercoloidi) o linfoplasmacellulari diffuse e di queste ultime rispetto ai controlli. Questo risultato, unitamente a differenti percentuali di cellule TUNEL+ tra i vari gruppi di animali, indica il possibile ruolo NF-kB nell'induzione dell'apoptosi macrofagica e quindi nella modulazione della risposta infiammatoria e nell'evoluzione della patologia. Questi effetti sono legati ad una aumentata suscettibilità all'infezione e mostrano indirettamente la presenza anche nella pecora di un analogo del gene Nod2 che interagendo con il MDP di Mycobacterium può regolare più o meno efficacemente l'attivazione del fattore NF-kB.

Parole chiave: pecora, paratubercolosi, NF-kB, muramyl dipeptide, gravità delle lesioni.

STRENGTHENING OF NF-kB ACTIVITY IN INTESTINES OF SHEEP AFFECTED WITH PARATUBERCULOSIS: POSSIBLE ROLE OF A NOD2-LIKE GENE MUTATION IN THE EVOLUTION OF INTESTINAL PATHOLOGY.

In man and in some animal models, variants of Nod2-gene and related protein, an intracytoplasmic sensor of bacteria-derived muramyl dipeptide (MDP), increase susceptibility to different intestinal pathogens. These gene variants are modified in activation of nuclear factor kB (NF-kB), a regulator in inflammation and antibacterial defence. To verify the role of NF-kB in intestinal phlogosis regulation during paratuberculosis, 14 affected and sero-microbiologically positive sheep and 4 unaffected controls were analyzed. We have compared the number of NF-kB immunohistochemical positive cells to levels of expression of IL-1 β and IL-6 evaluated by RT-PCR. These data were then confronted with the percentage of apoptotic nuclei of VPM32+ macrophages observed in the same affected intestinal tracts. Results showed that affected intestinal tract in with "lepromatous" (multibacillary) form to respect "tuberculoid" (paucibacillary) form was presented, exhibited highest number of NF-kB positive-cells in response to MDP and more efficient levels of IL-1 and IL-6 production, associated with high percentages of apoptotic macrophages. These effects are probably linked to increased susceptibility to mycobacterial MDP and down regulation of macrophages activity, and identify also in sheep a possible gene analogue to Nod2, as a positive regulator of NF-kB activation.

Key words: sheep, paratuberculosis, NF-kB, muramyl dipeptide, severity of lesions.

**RICERCA IMMUNOISTOCHEMICA DELLA PROTEINA CAPSIDICA P27 DEL VIRUS ARTRITE
ENCEFALITE CAPRINA (CAE) IN TESSUTI DI CAPRE SIERONEGATIVE**

Gelmetti Daniela¹, Giudice Chiara², Gaffuri Alessandra¹, Sacchi Cristina¹, Gibelli Lucia¹.

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lombardia-Emilia Romagna, Brescia; ²DIPAV, Sezione Anatomia Patologica Veterinaria, Università degli Studi di Milano

L'eradicazione della CAE, lentivirosi molto diffusa negli allevamenti caprini, si basa sul riconoscimento dei sieropositivi. Scopo del nostro lavoro è stato verificare, con metodiche immunocitochimiche, se capre sieronegative da lungo tempo alberghino ancora il virus in cellule riserva. Campioni di polmone, mammella, linfonodi e midollo osseo di 29 capre sieronegative (ELISA), fissati in formalina, sono stati valutati istologicamente ed immunocolorati con anticorpo monoclonale 1A7 diretto contro la proteina capsidica CA-p27. In 22/29 casi era presente polmonite interstiziale linfocitaria ed in 11/29 modica iperplasia del BALT. In 23/29 mammelle erano presenti numerosi galattoliti, associati a modica mastite interstiziale (21/29) e fibrosi moderata (12/29). Il midollo osseo, prevalentemente adiposo, era nella norma. CA-p27 risultava positiva in 12/29 capre. La positività, sempre citoplasmatica, era visibile in segmenti di epitelio bronchiale (8/12), nell'epitelio ghiandolare mammario (7/12) e, più raramente, in fibrociti e macrofagi stromali e nell'endotelio vascolare. Le cellule stromali del midollo osseo (BMSC) erano positive in 7/12 casi. La presenza di CA-p27 nelle BMSC completa quanto da noi osservato in capre sieropositive, e dimostra che il virus CAE, come già HIV e FIV, può eclissarsi in cellule riserva senza generare variazioni sierologiche rilevabili. Ulteriori studi sono necessari per chiarire la capacità replicativa del virus (tessuto colture) osservato nelle cellule riserva e per rendere i piani di risanamento più rispondenti alla patogenesi della CAE.

Parole chiave: Artrite-Encefalite caprina, capre, lentivirosi, retrovirosi, immunocitochimica.

**IMMUNODETECTION OF CAPSIDIC PROTEIN P27-CAEV IN TARGET TISSUES OF CAEV
SERONEGATIVE GOATS.**

Caprine arthritis-encephalitis (CAE) is a persistent lentiviral disease. CAE eradication programs are mainly based on serological screening of goats. Aim of our study was to immunohistochemically investigate different tissues from seronegative goats to verify if viral particles can be detected in reservoir cells. Samples of lung, mammary gland and bone marrow were obtained from 29 regularly sloughed goats, formalin fixed and processed for histology. Microtomic sections were HE stained and immunohistochemistry was performed with mAb 1A7 anti-capsidic protein CA-p27. Histologically, interstitial pneumonia was present in 22/29 lungs and moderate BALT hyperplasia in 11/29. Interstitial, lymphoplasmacytic mastitis was detected in 21/29 cases, and moderate mammary fibrosis in 12/29. Bone marrow samples were composed of normal adipose and fibro-vascular tissue. Ca-p27 was immunohistochemically detected in 12/29 goats. Segmental portions of bronchial epithelium stained positive in 8/12 cases, mammary epithelium was positive in 7/12. More rarely, stromal fibrocytes, macrophages and endothelial cells in both organs stained positive. Bone marrow stromal cells were positive in 7/12 cases.

CA-p27 immuno-detection in BMSCs, bronchial and mammary epithelium is consistent with previous results obtained on seropositive goats. Our observations on seronegative animals suggest that CAE virus, like other retroviruses (HIV; FIV), can subsist in reservoir cells of goats without detectable serum antibody. Further investigations (viral isolation) will be held to elucidate if CA-p27 staining in host cells indicate the presence of replicating CAE virus.

Key words: Caprine arthritis-encephalitis, goat, lentivirus, retrovirus, immunohistochemistry.

DETERMINAZIONE DELLE CELLULE SECERNENTI IFN- γ COME VALUTAZIONE FUNZIONALE DELLA RISPOSTA IMMUNITARIA CELLULO-MEDIATA IN SUINETTI DI DIFFERENTE ETÀ¹

Luca Ferrari⁽¹⁾, Francesca Miduri⁽¹⁾, Elena De Angelis⁽¹⁾, Attilio Corradi⁽¹⁾, Paolo Martelli⁽¹⁾, Paolo Borghetti⁽¹⁾

⁽¹⁾Dip. di Salute Animale, Università degli Studi di Parma

La produzione di IFN- γ parametro fondamentale di valutazione della risposta immunitaria cellulo-mediata, è stata determinata in suinetti di differenti età con tecnica ELISpot, procedura rapida e sensibile che permette di quantificare il numero di cellule secernenti citochine. Le cellule mononucleate, isolate da campioni di sangue periferico di suinetti di 3, 20, 29, 35, 90 giorni di vita, sono state seminate in piastre da 96 pozzetti rivestiti con anticorpo monoclonale P2G10 anti-*porcine* IFN- γ e stimolate per 20 h a 37°C con PHA (0.5-10 μ g/ml) o con vaccino Aujeszky, (*Porsilis*[®] Begonia; 0.1-1MOI). Mediante reazione immuno-enzimatica (AP) e sistema ottico di lettura (*AID*[™] *ELISpot Reader*) è stato valutato il numero di *spot*, riconducibile al numero di cellule secernenti IFN- γ . Gli animali di 3 e 20 giorni, non ancora sottoposti a stimolazione antigenica da vaccinazione (21°giorno: *PRRSV*; 30° giorno: *M. hyopneumoniae*) o da svezzamento (30° giorno), hanno mostrato una responsività ridotta, con un intervallo di linearità spostato verso concentrazioni più elevate di PHA (1-10 μ g/ml). Gli animali di 29 giorni (vaccinati per *PRRSV*) e di 35 giorni (svezzati e vaccinati anche per *M. hyopneumoniae*) hanno mostrato una responsività più intensa, con una riduzione dell'intervallo di linearità di risposta a valori più bassi di mitogeno (0.5-5 μ g/ml). Gli animali di 90 giorni hanno evidenziato una capacità responsiva alla PHA molto più pronunciata (<1 μ g/ml); la risposta di tali animali, vaccinati da 4 settimane contro il virus di Aujeszky, è risultata intensa ed inversamente proporzionale al titolo del virus vaccinale usato per la stimolazione *in vitro*. L'aumento del numero di cellule secernenti IFN- γ , in dipendenza dall'età dell'animale, può essere ricondotto all'aumento del numero di linfociti CD4⁺CD8⁺, CD3⁺CD8⁺ e CD4⁺CD8⁺.

Parole chiave: ELISpot, suinetti, linfociti, IFN- γ .

DETERMINATION OF IFN- γ SECRETING CELLS AS A FUNCTIONAL EVALUATION OF CELL-MEDIATED IMMUNE RESPONSE IN PIGLETS OF DIFFERENT AGE.

IFN- γ production, a fundamental parameter for the evaluation of cell-mediated immune response, was determined in piglets of different age by an ELISpot assay, a rapid and sensitive technique which allows to quantitate the number of cytokine secreting cells. PBMC were isolated from peripheral blood samples of 3, 20, 29, 35 and 90 day old piglets, plated into 96-well plates, coated with anti-*porcine* IFN- γ mAb P2G10, and stimulated for 20 h at 37°C with PHA (0.5-10 μ g/ml) or with *Porsilis*[®] vaccine against Aujeszky's virus (*Begonia* strain; 0.1-1MOI). The number of IFN- γ secreting cells, as number of spots, was evaluated by an immunoenzymatic reaction (AP) and an optical analyser (*AID*[™] *ELISpot Reader*). 3 and 20 day old piglets, not yet stimulated by vaccines (21st day: *PRRSV*; 30th day: *M. hyopneumoniae*) or by weaning (30th day), showed a low response with a linear range shifted to higher PHA concentrations (1-10 μ g/ml). 29 day old (*PRRSV* vaccinated) and 35 day old (weaned and also *M. hyopneumoniae* vaccinated) piglets showed a higher response with a reduction of the linear range at lower concentrations of mitogen (0.5-5 μ g/ml). 90 day old piglets exhibited a much higher response to PHA (<1 μ g/ml). The response in these animals, vaccinated against Aujeszky's virus 4 weeks before, showed a strong reactivity with an inverse relationship as regards the viral titre used for the *in vitro* stimulation. The increase of IFN- γ secreting cells, with respect to the age of the animals, can be associated to the increase of CD4⁺CD8⁺, CD3⁺CD8⁺ and CD4⁺CD8⁺ lymphocytes.

Key words: ELISpot, piglets, lymphocytes, IFN- γ .

ACCUMULO DI PrP^{Sc} NEL TESSUTO NERVOSO SENZA APPARENTE INTERESSAMENTO DEL TESSUTO LINFATICO IN OVINI DI RAZZA SARDA AFFETTI DA SCRAPIE

¹Ligios Ciriaco, ²Cancedda Maria Giovanna, ¹Saba Mariangela, ¹Santucci Cinzia, ¹Maestrale Caterina, ³Agrimi Umberto, ⁴Ru Giuseppe, ⁵Di Guardo Giovanni

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna; 2Istituto Zootecnico Caseario della Sardegna; 3Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento di Sanità Alimentare ed Animale; 4CEA, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, della Liguria e della Valle D'Aosta; 5Università degli Studi di Teramo, Facoltà di Medicina Veterinaria, Dipartimento di Scienze Biomediche Compare.

Negli ovini colpiti da scrapie, l'accumulo di PrP^{Sc} nel sistema linfo-reticolare (SLR) e nel sistema nervoso periferico avviene di regola prima che nel sistema nervoso centrale (SNC). Scopo del presente lavoro è stato quello di valutare il coinvolgimento del SLR in ovini di razza Sarda affetti da scrapie in forma clinica e preclinica. Lo studio è stato effettuato su 1.024 soggetti di razza Sarda clinicamente sani e provenienti da 8 greggi nei quali si erano verificati casi clinici di scrapie. Un gruppo di 47 ovini clinicamente affetti da scrapie, in parte appartenenti agli stessi greggi, sono stati inclusi nella ricerca. Su tutti questi soggetti sono stati effettuati appropriati esami immunostochimici (IHC) ed immunobiochimici (WB) al fine di determinare la presenza di PrP^{Sc} nei tessuti linfatici e nervosi. Dei 1.024 ovini clinicamente sani, 69 sono stati rinvenuti affetti da scrapie. Presenza di PrP^{Sc} è stata evidenziata in 60 di essi, mediante IHC e WB nel SNC (a livello di *obex*) o, con l'ausilio della sola IHC, nei plessi del sistema nervoso enterico (SNE). Nei rimanenti 9 di questi 69 soggetti, PrP^{Sc} è stata dimostrata solamente a livello del SLR. PrP^{Sc} è stata altresì dimostrata, mediante IHC e WB, nel SNC, nonché con l'ausilio della sola IHC nel SNE dei 47 ovini clinicamente affetti. Tuttavia, 18 dei 69 animali clinicamente sani (26%, 17 con genotipo ARQ/ARQ, 1 con genotipo ARQ/AHQ) e 3 con genotipo ARQ/ARQ del gruppo clinicamente affetto non hanno mostrato PrP^{Sc} nel SLR tramite IHC e WB. Il nostro studio dimostra che, in ovini di razza Sarda con genotipo ARQ/ARQ e ARQ/AHQ affetti da scrapie, una certa percentuale di essi presenta accumuli di PrP^{Sc} nel SNC e nell'SNE senza apparente coinvolgimento del SLR.

Parole chiave: scrapie, ovino, patogenesi.

PRPSC DEPOSITION IN NERVOUS TISSUES WITH NO APPARENT LYMPHOID TISSUE INVOLVEMENT IN SARDA SHEEP AFFECTED WITH NATURAL SCRAPIE.

The present study reports the involvement of nervous and lymphoid tissues in Sarda breed sheep naturally affected with preclinical and clinical scrapie. Our investigation was carried out on 1,024 clinically healthy Sarda breed sheep belonging to 8 scrapie-affected flocks. A group of 47 sheep clinically affected with natural scrapie were also included in the study. Nervous and lymphoid tissues of these sheep were submitted to appropriate immunohistochemistry (IHC) and Western-blot (WB) protocols for PrP^{Sc} detection. A total of 69 out of the 1,024 clinically healthy sheep were found to be scrapie infected, since PrP^{Sc} was detected, by means of both IHC and WB, in the CNS (*obex* region) and, by means of IHC alone, within enteric nervous system (ENS) plexuses from 60 of the above sheep. Furthermore, IHC and WB yielded evidence of PrP^{Sc} deposition only in lymphoid tissues from the remaining 9 out of the 69 clinically healthy sheep. PrP^{Sc} was also detected, by IHC and WB, in the CNS as well as, by IHC alone, in ENS plexuses from all the 47 clinically affected sheep. Nevertheless, 18 out of the 69 clinically healthy animals (26%, 17 ARQ/ARQ and 1 ARQ/AHQ sheep), along with 3 ARQ/ARQ sheep (6%) of the clinically affected group, showed no IHC nor WB evidence of PrP^{Sc} in a number of lymphoid tissues. The present study demonstrates, in ARQ/ARQ and ARQ/AHQ Sarda breed sheep affected with natural scrapie, dual CNS and ENS PrP^{Sc} deposition, opposed in a number of cases by an apparent lack of lymphoid tissue involvement.

Key words: scrapie, sheep, pathogenesis.

INTRODUZIONE

Nella patogenesi della scrapie l'accumulo della proteina prionica patologica (PrP^{Sc}) sia a livello di numerosi distretti del Sistema Linforeticolare (SLR) (Schreuder *et al.*, 1996; Andréoletti *et al.*, 2000; Heggebo *et al.*, 2000) che dei Plessi Nervosi Enterici (PNE) precede, con un intervallo variabile di tempo, quello nel Sistema Nervoso Centrale (SNC) (van Keulen *et al.*, 1996). Tuttavia, in alcuni modelli sperimentali, come ad esempio nell'hamster, si è osservato come sia possibile avere una neuroinvasione senza un precedente coinvolgimento del SLR (Beekes *et al.*, 1996). La scrapie è il

risultato di una complessa interazione tra un agente trasmissibile sconosciuto ed uno o più fattori genetici essendo stata accertata la presenza, nel gene che codifica per la PrP, di diversi polimorfismi in grado di condizionare la sensibilità individuale e di razza a contrarre la malattia (Hunter et al. 1991, Hunter et al., 1994). Fra questi polimorfismi i più importanti sono quelli a livello dei codoni 136, 154 e 171 che codificano rispettivamente per Alanina/Valina (A/V), Arginina/Istidina (R/H) e Arginina/Istidina/Glutamina (R/H/Q). Nella razza Sarda i genotipi associati alla scrapie sono l'ARQ/ARQ, l'ARQ/AHQ e l'AHQ/AHQ. Il presente lavoro riporta come, in una percentuale di ovini ARQ/ARQ e l'ARQ/AHQ di razza Sarda affetti da scrapie in forma clinica o preclinica, possa apparentemente mancare il coinvolgimento del SLR durante la patogenesi della malattia.

MATERIALE E METODI.

La nostra indagine è stata effettuata su 1.050 ovini di razza Sarda di età differente (da 7 mesi a 6 anni) appartenenti a 8 greggi nei quali si erano verificati, con diversa prevalenza, casi di scrapie. Inoltre, un gruppo di 49 pecore con scrapie clinicamente manifesta di età compresa tra 3 e 5 anni, per la maggior parte provenienti dai summenzionati greggi sono state incluse nello studio. Sulla base dell'attuale legislazione europea tutti i suddetti ovini (1.050 clinicamente sani e 47 clinicamente malati) sono stati sacrificati e sottoposti a necropsopia. Durante la necropsopia venivano prelevati: l'*obex*, che era diviso con un taglio sagittale mediano in due parti di cui una congelata a -20°C , per l'esame western-blotting (WB) ed una fissata in formalina tamponata 10% per l'esame immunoistochimico (IHC) e istologico; le tonsille, delle quali una era congelata a -20°C per il WB ed una fissata in formalina tamponata 10% per l'IHC. Infine, dagli animali con scrapie clinica e da 60 capi asintomatici provenienti da uno degli 8 greggi inclusi nello studio, la valvola ileocecale veniva prelevata e fissata in formalina tamponata 10% per gli esami IHC. Su tutti i capi oggetto della nostra indagine è stato prelevato un campione di sangue in EDTA per la determinazione dei polimorfismi ai codoni 136, 154 e 171. Infine da campioni di sangue in EDTA di 16 pecore appartenenti al gruppo delle clinicamente sane, risultate affette da scrapie perché con PrP^{Sc} nel SNC e nel SRL (n° 12) o solo nel SNC (n° 4), veniva estratto DNA genomico per il sequenziamento diretto di tutto il gene che codifica per la proteina prionica.

Esame immunoistochimico – Per l'esame immunoistochimico, dai vari campioni erano allestite delle sezioni su vetrini che venivano sparaffinate, reidratate ed infine trattate con acido formico per 2 min. e poste in autoclave per 10 min. a 121°C . Come anticorpo primario venivano utilizzati 34C9 (Prionics) e F99 (VMRD); la reazione immunologica era poi evidenziata con un sistema ABC (*Avidina Biotina Complex* – Vector) e con 3,3'-diaminobenzidina.

Western Blotting - I campioni, trattati prima con la collagenase A (Roche - 0,25% w/v, 2h a 37°C) in TBS e CaCl_2 2 mM, erano centrifugati (31.500g/30min/ 4°C) e successivamente digeriti con la proteinasi K. Dopo centrifugazione i campioni erano denaturati in loading buffer a 95°C , e sottoposti a migrazione elettroforetica in gel SDS-PAGE (Invitrogen). La rivelazione immunologica veniva effettuata con l'anticorpo primario 6H4 (Prionics) e mediante chemiluminescenza (CDP-Star, Roche).

Analisi genetiche – Per la determinazione dei polimorfismi ai codoni 136, 154 e 171 abbiamo utilizzato la tecnica di discriminazione allelica TaqMan, mediante lo strumento ABI PRISM 7000 di real time PCR (Applied BioSystem).

Per il sequenziamento del gene codificante per la PrP, dal DNA estratto si è effettuata una amplificazione mediante PCR del gene della PrP con primers disegnati alle estremità:

PrP1(+), 5' ATGGTGAAAAGCCACATAGGCAGT3'

PrP2(-), 5' CTATCCTACTATGAGAAAAATGAG 3'.

La reazione è stata effettuata con 30 cicli a 94°C per 30", a 59°C per 30", a 72°C per 45".

La sequenza del DNA è stata determinata su entrambe le catene mediante sequenziatore automatico 3100 Applied Biosystem. Le sequenze ottenute sono state allineate con la sequenza del gene della pecora Sarda depositata in GenBank (n°AF195247) mediante software Bioedit.

Analisi statistiche – Il test del *Chi quadro* è stato utilizzato per comparare, tra il gruppo dei pre-clinicamente e quello dei clinicamente affetti, le frequenze di soggetti senza PrP^{Sc} nel SLR. Eventuali associazioni tra presenza/assenza di PrP^{Sc} nel linfatico e genotipo sono state verificate statisticamente con lo stesso test.

RISULTATI.

Un totale di 69 delle 1.050 pecore clinicamente sane sono state confermate affette da scrapie. Di queste 69 pecore, 60 presentavano PrP^{Sc} sia nel SNC - a livello dell'*obex* - che nel PNE, mentre 9 mostravano PrP^{Sc} esclusivamente nella tonsilla e nel linfonodo retrofaringeo. PrP^{Sc} era lo stesso evidenziato nel SNC (Fig. 1) e nel PNE (Fig. 2) delle 47 pecore con sintomatologia neurologica riferibile a scrapie incluse nell'indagine. Tuttavia, 18 delle 69 pecore asintomatiche affette da scrapie (26%, 17 ARQ/ARQ e 1 AHQ/ARQ) (Tabella 1) e 3 pecore clinicamente affette con genotipo ARQ/ARQ (6%) non presentavano depositi di PrP^{Sc} in nessuno dei distretti del SRL esaminati con l'WB e l'esame IHC. Il sequenziamento diretto del gene della PrP^{Sc} confermava il genotipo ARQ/ARQ per tutti i 16 soggetti esaminati.

Non sono stati rilevati altri polimorfismi ad eccezione del codone 176 dove la Asparagina era sostituita in omozigosi dalla Lisina. Le analisi statistiche non hanno dimostrato nessuna associazione con particolari genotipi sebbene ben 17 delle 60 pecore ARQ/ARQ e solo 1 delle 9 pecore AR(H)Q/AR(H)Q non presentavano PrP^{Sc} nel SLR. Il numero dei soggetti affetti da scrapie senza PrP^{Sc} nel SLR è significativamente ($P=0.007$) superiore nel gruppo dei preclinici rispetto a quello dei clinici.

DISCUSSIONE

Sulla base dei nostri risultati si può affermare che gli ovini di razza sarda affetti da scrapie, sia quelli sintomatici che quelli asintomatici, hanno uno dei seguenti genotipi ARQ/ARQ, ARQ/AHQ e AHQ/AHQ così come riportato precedentemente da altri autori (Vaccari *et al.*, 2001, Acutis *et al.*, 2003). Riteniamo interessante sottolineare come in una certa percentuale (26%) di ovini ARQ/ARQ e ARQ/AHQ sardi, affetti clinicamente o pre-clinicamente da scrapie con accumulo nel CNS e nell'ENS di PrP^{Sc}, ci possa essere un apparente mancato coinvolgimento del SLR. L'apparente assenza di PrP^{Sc}, significativamente più evidente nelle pecore precliniche rispetto a quelle cliniche riflette molto probabilmente una patogenesi caratterizzata da precoce accumulo di PrP^{Sc} nel nucleo del vago che risulta anatomicamente connesso con il plesso mioenterico (Van Kulen *et al.*, 2000, McBride *et al.*, 2001). In seguito solo nello stadio clinico si avrebbe un coinvolgimento del linfatico, per via centrifuga. Un apparente mancato coinvolgimento del tessuto linfatico è stato riportato nelle ARQ/ARQ di razza Romney infettate sperimentalmente con la l'agente della BSE (Jeffrey *et al.*, 2001) e in due VRQ/ARQ pecore clinicamente affette da scrapie delle isole Shetland (Jeffrey *et al.*, 2002), ma per quanto ci risulta, mai pubblicato nelle ARQ/ARQ con scrapie naturale.

La mancanza di altri polimorfismi, al codone 154, se si esclude l'unico polimorfismo al codone 176, potrebbe significare che non vi sia una diversità genetica, almeno a livello del gene della PrP^{Sc} che spieghi questi differenti comportamenti patogenetici. Una probabile causa dovuta al fatto che nell'infezione sarebbero implicati ceppi di scrapie con un diverso linfotropismo non può essere esclusa. Tuttavia, considerato che è stata segnalata una evidente omogeneità fenotipica dei ceppi di scrapie isolati dai focolai di malattia nella pecora di razza Sarda in Italia (Nonno *et al.*, 2001), altri fattori come età dell'ospite al momento dell'infezione, dose infettante e fattori genetici sconosciuti, non legati al gene della PrP, potrebbero giocare un ruolo più determinante.

CONCLUSIONE

I nostri risultati dimostrano ancora una volta la grande variabilità degli aspetti patogenetici presenti nella scrapie ovina e di conseguenza l'impossibilità di dare un valore generale ad un dato ottenuto su un determinato genotipo, razza o area geografica.

BIBLIOGRAFIA

- Acutis, P.L., Ligios, C., Fraghi, A., Ru, G., Maestrale, C., Riina, M.V., Vaccari, G., Agrimi U., Caramelli, M. & Carta, A. (2003). Susceptibility to scrapie of AHQ allele in Italian sheep population. *Conference on methods for control of scrapie* 15 & 16 May, Oslo.
- Andréoletti, O., Berthon, P., Marc, D., Sarradin, P., Grosclaude, J., van Keulen, L., Schelcher, F., Elsen, J-M. & Lantier, F. (2000). Early accumulation of PrP^{Sc} in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie. *J Gen Virol* 81, 3115-3126.
- Beekes, M., Baldauf, E. & Diringer, H. (1996). Sequential appearance and accumulation of pathognomonic markers in the central nervous system of hamsters orally infected with scrapie. *J Gen Virol* 77, 1925-1934.
- McBride, P. A., Schulz-Schaeffer, W. J., Donaldson, M., Bruce M., Diringer, H., Kretzschmar, H. A. & Beekes, M. (2001) Early spread of scrapie from gastrointestinal tract to the central nervous system involves autonomic fibers of the splanchnic and vagus nerves. *J Virol* 75, 9320-9327.
- Heggebo, R., Press, C.M.L., Gunnes, G., Kai, I.L., Tranulis, M.A., Ulvund, M., Groschup, M.H. & Landsverk, T. (2000). Distribution of prion protein in the ileal Peyer's patch of scrapie-free lambs and lambs naturally and experimentally exposed to the scrapie agent. *J Com Pathol* 81, 2327-2337.
- Hunter, N., Foster, J. D., Benson, G. & Hope, J. (1991). Restriction fragment length polymorphisms of the scrapie-associated fibril protein (PrP) gene and their association with susceptibility to natural scrapie in British sheep. *J Gen Virol*, 72, 1287-1292.
- Hunter, N., Goldmann, W., Smith, G. & Hope, J. (1994). The association of a codon 136 PrP gene variant with the occurrence of natural scrapie. *Arch Virol* 137, 171-177.
- Jeffrey, M., Ryder, S., Martin, S., Hawkins, S. A., Terry, L., Berthelin-Baker, C. & Belloworthy, S. J. (2001). Oral inoculation of sheep with the agent of bovine spongiform encephalopathy (BSE). Onset and distribution of disease-specific PrP accumulation in brain and viscera. *J Comp Pathol* 124, 280-289.
- Jeffrey, M., Begara-McGorum, I., Clark, S., Martin, S., Clark, J., Chaplin, M., González, L. (2002). Occurrence and distribution of infection-specific PrP in tissues of clinical scrapie cases and cull sheep from scrapie-

affected farms in Shetland. *J Comp Pathol* 127, 264-273. Nonno, R., Esposito, E., Vaccari, G., Conte, M., Marcon, S., Di Bari, M., Ligios, C., Di Guardo G. & Agrimi U. (2003). Molecular analysis of Italian sheep scrapie and comparison with cases of bovine spongiform encephalopathy (BSE) and experimental BSE in sheep. *J Clin Microb* 41, 9, 4127-4133. Schreuder, B.E., van Keulen, L.J., Vromans, M.E., Langeveld, J.P. & Smits, M. A. (1996). Preclinical test for prion diseases. *Nature* 381, 563. Vaccari, G., Petraioli, R., Agrimi, U., Eleni, C., Perfetti, M. G., Di Bari, M. A., Morelli, L., Butani, L., Ligios, C. & Di Guardo, G. (2001). PrP genotype in Sarda breed sheep and its relevance to scrapie infection. *Arch Virol* 146, 2029-2037. van Keulen, L. J. M., Schreuder, B. E. C., Wromans, M. E. W., Langeveld, J. P. M. & Smits M. A. (2000). Pathogenesis of natural scrapie in sheep. *Arch of Virol Suppl.* 16, 57-71. van Keulen, L. J. M., Schreuder, B. E. C., Meloen, R. H., Mooij-Harkes, G., Vromans, M. E. W., & Langeveld, J. P. M. (1996). Immunohistochemical detection of prion protein in lymphoid tissues of sheep with natural scrapie. *J Clin Microbiol* 34, 1228-1231.

Tabella 1. Pecore asintomatiche affette da scrapie provenienti dagli 8 greggi oggetto dell'indagine. Risultati ottenuti con l'esame WB e IHC a livello dell'obex (SNC), tonsilla e linfonodo retrofaringeo (SRL) e plesso nervoso enterico (PNE).

n° pecore	Genotipo	SNC		SLR		PNE
		IHC	WB	IHC	WB	IHC
17	ARQ/ARQ	+	+	-	-	+
1	AHQ/ARQ	+	+	-	-	+
34	ARQ/ARQ	+	+	+	+	+
2	AHQ/AHQ	+	+	+	+	+
6	AHQ/ARQ	+	+	+	+	+
9	ARQ/ARQ	-	-	+	+	+

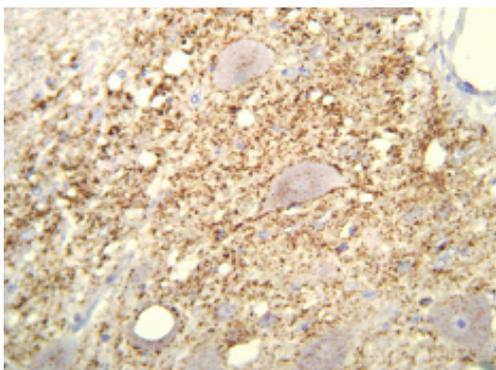


Fig.1 a

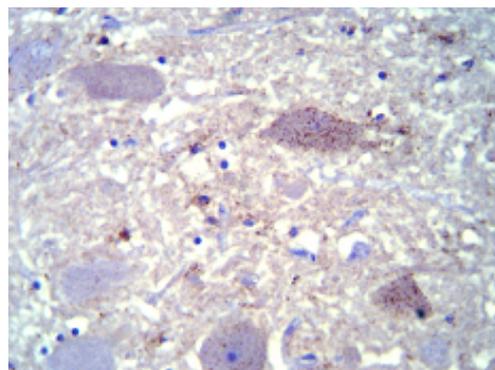


Fig.1 b

Figura 1: Ovino con scrapie clinica (A) e preclinica (B). Midollo allungato. Deposizione ad aspetto finemente puntato di PrP^{Sc}. L'intensità della colorazione denota un maggiore deposito di PrP^{Sc} nell'ovino con scrapie clinica. Biotina-streptavidina, anticorpo F99, colorazione con DAB. 400X.

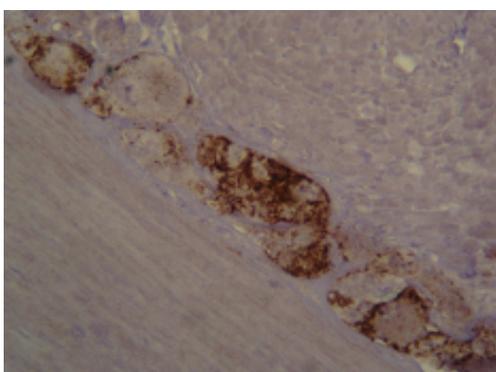


Figura 2: Ovino con scrapie. Ileo. Accumuli intraneuronali di PrP^{Sc} nel plesso nervoso mioenterico. Biotina-streptavidina, anticorpo F99, colorazione con DAB. 400X.

BVD, RILIEVI ISTOPATOLOGICI ED IMMUNOISTOCHEMICI IN FETI BOVINI ABORTITI: STUDIO DI CAMPO

Pittioni Eugenio, Pascotto Ernesto, Galeotti Marco

Dipartimento di Scienze animali, Facoltà di Medicina veterinaria, Università degli Studi di Udine

Diversi studi hanno indagato sugli aspetti immunostochimici delle lesioni indotte in condizioni sperimentali da virus BVD su feti bovini, mentre risultano carenti le informazioni relative alle lesioni riscontrabili in seguito ad infezioni abortive in campo. Il presente studio illustra i risultati ottenuti tramite metodica immunostochimica con anticorpo monoclonale anti-BVDV su sezioni di organi di feti abortiti di bovino. I campioni oggetto dello studio provengono da prelievi necroscopici effettuati in campo da veterinari liberi professionisti nel periodo aprile 2003 – aprile 2005. La fissazione in formalina degli organi di feto è avvenuta dopo intervalli di tempo variabili in funzione delle condizioni di campo. Uno “screening” istologico delle lesioni osservate nei tessuti ha consentito di individuare i campioni da avviare alle indagini immunostochimiche in funzione delle lesioni osservate. Le localizzazioni prevalenti delle lesioni istologiche erano a livello di intestino, milza e organi linfoidi mentre la positività ottenuta con l’anticorpo monoclonale era evidenziabile nella zona paranucleare delle cellule epiteliali delle cripte intestinali. Sono risultate positive anche cellule mononucleate di probabile origine istiocitaria presenti nell’intestino ed in altri organi. Il tipo di lesioni riscontrate e la loro distribuzione, nonché la positività immunostochimica, confermano sostanzialmente i rilievi ottenuti nelle indagini sperimentali da altri autori, anche se non sono stati osservati alcuni degli aspetti descritti in letteratura. I risultati della ricerca integrano le conoscenze pratico-applicative della diagnostica routinaria tramite immunostochimica e ne confermano l'utilità in aree di infezione endemica.

Parole chiave: BVD aborto feto istopatologia immunostochimica.

BVD, HISTOPATHOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL FINDINGS IN ABORTED BOVINE FETUS: A FIELD STUDY.

Some authors have investigated immunohistological aspects of BVDV lesions in bovine fetus in experimental condition, but information about field infections are poor. The present study shows the results obtained by application of immunohistochemistry with a monoclonal antibody against BVDV on histological section of organs from naturally aborted bovine fetus. The samples were collected on field by professional veterinarians from April 2003 until April 2004. The formalin fixation of the samples was done in the farms after variable periods of time depending on working conditions. After a first histological examination, immunohistochemistry was performed on the cases that showed compatible lesions with the presence of BVDV. The most frequent location of histological lesions was observed in the intestine, spleen and lymphoid organs. The immunohistochemical positivity was localized in a paranuclear position of epithelial cells of intestinal crypts. Positivity was also seen in mononuclear cells, of probable histiocytic origin, of the intestine and other organs. The aspects and distribution of the lesions and immunohistochemical positivity confirm in substance the results of experimental researches, but some aspects described previously were not seen here. This study integrates working and applicative knowledges of routine immunohistochemical diagnostic procedure, and confirms its usefulness in endemic areas.

Key words: BVD abortion fetus histopathology immunohistochemistry.

INTRODUZIONE

Il virus della Diarrea Virale Bovina (BVDV) è un virus a singolo filamento di RNA, appartenente alla famiglia Flaviviridae, genere Pestivirus, altamente patogeno per gli animali sensibili della specie bovina. Sia in condizioni naturali che sperimentali, le manifestazioni cliniche della malattia sono piuttosto varie in relazione al tipo di virus, al suo ceppo e alla sua virulenza. Tuttavia, fin dalle prime apparizioni della malattia (Stato di New York, USA, 1946) ai vari quadri clinici si associano costantemente problemi nella sfera riproduttiva (Cavirani 2002). La malattia, infatti, ha solitamente esiti differenti sulla gravidanza in relazione all'età del feto: riassorbimento embrionale, aborto, animali nati con malformazioni, animali vivi, vitali ma immunotolleranti nei confronti del virus (Roeder et al 1986, Done et al 1980).

Le metodiche impiegate per la rilevazione del virus, partendo da campioni fetali, includono: l'isolamento virale, la PCR e l'immunoistochimica (Haines et al. 1992, Bhudevi e Weinstock 2003). Quest'ultima metodica è stata ritenuta utile al fine diagnostico da diversi autori (Aly et al. 2003, Fredriksen et al. 1999, Baszler et al. 1995), tuttavia tale affermazione è per lo più basata su ricerche su animali adulti o su feti abortiti in condizioni sperimentali. Nel presente lavoro vengono valutati gli aspetti istopatologici ed immunoistochimici riscontrabili in feti naturalmente abortiti.

MATERIALI E METODI

Casistica e campionatura

Sono stati analizzati i campioni di 42 feti bovini abortiti naturalmente reperiti in stalle della pianura Pordenonese e della zona di Cividale e Valli del Natisone (Nord-est della provincia di Udine) nel periodo aprile 2003 – aprile 2005. La necropsia e la campionatura dei feti è avvenuta in campo ad opera di veterinari liberi professionisti. I tempi intercorrenti fra aborto e necropsia sono stati registrati. Basandosi sulla letteratura presente (Del Piero, 2003, Cavarani, 1999) gli organi campionati sono stati: lingua, encefalo, timo, polmone, cuore, prestomaci, intestino, fegato, milza, muscolo diaframmatico, cute, placenta.

Istopatologia

I campioni tissutali sono stati fissati in formalina tamponata al 10% per periodi di tempo variabili e portati al laboratorio. La processazione, taglio e colorazione sono state effettuate secondo le metodiche attualmente in uso.

Interpretazione dei preparati

Tutte le sezioni hanno subito una preliminare valutazione parametrizzata finalizzata a definire la qualità dei preparati; sono state stimate la completezza strutturale, il dettaglio citoplasmatico e il dettaglio nucleare.

I casi considerati idonei alla lettura, sono stati interpretati istologicamente seguendo un protocollo predefinito (la modulista relativa è a disposizione dagli autori).

Immunoistochimica

Sulle sezioni d'organo con lesioni compatibili con l'infezione da BVDV è stata applicata la metodica immunoistochimica. Tale procedura ha previsto le normali prassi di sparaffinatura, blocco delle endoperossidasi (H₂O₂ al 3% per 15 min.), svelamento dell'antigene (tripsina bovina allo 0,5% per 30 min. a temp. 37°), blocco dei siti aspecifici (siero normale di capra per 30 min.). L'anticorpo primario utilizzato è stato fornito dall'IZS dell'Emilia e Lombardia, monoclonale, ottenuto da ibridoma di topo, è stato diluito 1:40 con un'incubazione di 2 ore a temp. ambiente. Quindi è stato applicato l'anticorpo ponte ottenuto da capra contro le immunoglobuline di topo (DakoCytomation E0433) diluito 1:200 per 30 min, e, di seguito, il complesso rivelatore (ABCComplex DakoCytomation K0355). Questo è stato fatto reagire con il cromogeno (Diaminobenzidina 0,05% per 7 minuti). La procedura è terminata con la controcolorazione all'ematosilina, la disidratazione e il montaggio in resina sintetica.

RISULTATI

Il tempo medio intercorso tra aborto e necropsia è stato di 10 ore (dev.st. 8). 26 casi su 42 si sono dimostrati idonei all'interpretazione istologica (valutazione parametrizzata), sono state così interpretate oltre 345 sezioni d'organo (media organi per caso: 12, dev. st. 3). 14 casi hanno mostrato lesioni compatibili con BVDV, di questi 4 sono risultati positivi alla prova immunoistochimica.

Istopatologia

Pur con quadri istopatologici differenti, in tutti i campioni dei quattro casi si è rilevato un costante interessamento dell'apparato gastroenterico e degli organi emolinfatici.

Per quanto concerne l'apparato gastroenterico lesioni si riscontrano in sede abomasale ed enterica. In abomaso le lesioni comprendono emorragie e la presenza di infiltrati di tipo linfocitario e granulocitario eosinofilo, lesioni, comunque, di lieve entità. Più complesso il quadro istopatologico riscontrabile nell'intestino, in particolare nel tenue. In questa sede in 3 casi su 4 si osservano anomalie morfologiche dei villi, che appaiono generalmente claviformi, talvolta ramificati o fogliiformi e tozzi (atrofia rigenerativa), sempre a livello della mucosa intestinale si osserva (2 casi su 4) una discreta congestione vasale, infine sono presenti diversi tipi di infiltrati cellulari (in due casi linfocitario e nei rimanenti granulocitario eosinofilo, con entità da modesta a discreta). Quando presenti nelle placche del Peyer si rileva linfangectasia, iperplasia reattiva e iperplasia della vascolarizzazione. Quadri simili ma di minore entità si rilevano nell'intestino crasso, che tuttavia per un caso non è stato campionato.

Lesioni istopatologiche rilevanti nel timo sono rappresentate da iperplasia corticale e manicotti perivascolari costituiti da granulociti eosinofili, in due casi si rileva anche iperplasia midollare, inoltre si rileva la presenza di infiltrato

granulocitario eosinofilo in prossimità e nella matrice cheratinica dei corpuscoli di Hassal. Questi ultimi evidenziano talvolta microfocolai necrotici.

In ambito splenico 3 casi evidenziano ipoplasia dei noduli linfatici (entità da lieve ad elevata), 2 deplezione della linea linfoide; in un solo caso si rileva un infiltrato granulocitario eosinofilo diffuso, peraltro di lieve entità.

Nei restanti organi i quadri patologici non sono costanti e, quando presenti, di entità comunque lieve o modesta; si osservano aspetti infiltrativi linfocitari e/o granulocitari eosinofili soprattutto a livello perivasale nel fegato, cuore, cute e polmone, in un caso l'encefalo ed il fegato presentano quadri emorragici di discreta entità.

Immunoistochimica

Come suggerito dall'istopatologia, ma in maniera più costante, le positività immunoistochimiche a BVDV si presentano più frequenti ed intense negli organi emolinfatici e nell'apparato gastroenterico. Si riscontra intensa positività (citoplasmatica, omogenea) in cellule mononucleate di probabile origine macrofagica/istiocitica (cellule MI) in quasi tutti gli organi esaminati, tali cellule sono presenti in numero variabile soprattutto negli spazi intercellulari della componente connettivale (spazi perivascolari, spazi peribronchiali, capsula, tonache sierosa, mucosa e sottomucosa). Tali cellule risultano più numerose a livello splenico, timico ed intestinale. A livello abomasale si riscontra positività multifocale intracitoplasmatica (paranucleare) nelle cellule epiteliali. Più evidente ed intensa, la stessa positività viene espressa nelle cellule delle cripte Lieberkuhn dell'intestino tenue ed, in minor misura, da quelle del crasso.

A livello delle placche del Peyer, si rilevano alcune positività (citoplasmatiche, omogenee) a carico di cellule MI, diffuse nella struttura dei linfonodi.

Alcune cellule MI positive sono presenti nella midollare del timo ed, in particolar modo, nelle vicinanze dei corpuscoli di Hassal. Numerose cellule MI positive si concentrano nei manicotti perivascolari della polpa bianca della milza.

Nella cute un discreto numero di cellule positive (positività citoplasma, omogenea, finemente granulare) di incerta definizione si localizzano a livello delle papille dermiche del follicolo.

DISCUSSIONE

I risultati istopatologici osservati sono in buona parte coerenti con quelli descritti in letteratura, soprattutto per quanto riguarda gli organi emolinfatici (Baule et al. 2001, Marshall et al 1996). Tuttavia nei lavori reperibili in letteratura si fa poco o nullo riferimento ai quadri istopatologici dell'apparato gastrointestinale, in particolare del costante e spesso ben evidente stato di alterazione morfologica dei villi. Una possibile spiegazione a questo potrebbe trovarsi nel fatto che gli studi con descrizione degli aspetti istopatologici riguardano in massima parte campioni ottenuti da animali adulti, in cui il virus porta a lesioni di tipo emorragico, necrotico o necrotico/ulcerativo a seconda del ceppo virale (Marcato 2002), mentre non si trovano descrizioni istopatologiche esaustive in casi di feti abortiti.

Per quanto riguarda l'immunoistopatologia, le positività descritte nel presente lavoro, ad eccezione della positività nelle papille dermiche, sono state riscontrate anche da altri autori. Tuttavia è interessante notare come da autore ad autore, oltre ai risultati qui descritti, si aggiungano siti di positività differenti, quali: le cellule endoteliali e della tonaca muscolare dei vasi (Haines et al. 1992, Fredriksen et al. 1999), i neuroni (Fernandez et al. 1989), gli epatociti (Aly et al. 2003), i trofoblasti (Blaszler et al. 1995) e i glomeruli renali (Shin e Acland 2001). Le condizioni di campo del presente studio (infezione naturale, fissazione tardiva) possono certamente essere i principali responsabili delle differenze quali-quantitative immunoistochimiche rilevate; tali condizioni infatti possono aver influito sull'espressività antigenica dei campioni. Inoltre vi sono discordanze interpretative su quale sia la precisa popolazione di appartenenza delle cellule MI (Fredriksen et al. 1999).

CONCLUSIONE

Le descrizioni istopatologiche e di positività immunoistochimica del presente lavoro integrano i dati riportati in letteratura, per lo più riferiti ad infezioni sperimentali su feti o a soggetti adulti. L'omogeneità, la tipicità e l'intensità delle lesioni istologiche rilevate dimostrano l'efficacia di una fine valutazione istopatologica nell'indirizzare ulteriori indagini immunoistochimiche, di cui viene confermata l'utilità nella diagnostica routinaria.

RINGRAZIAMENTI

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

BIBLIOGRAFIA

- 1) Aly N.M., Shehab G.G., e Abd El-Rahim I.H.A. (2003) "Bovine viral diarrhoea, bovine herpesvirus and parainfluenza-3 virus infection in three cattle herds in Egypt in 2000". Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.; 22(3):879-892.
- 2) Baszler T.V., Evermann J.P., Kaylor P.S., Byington P.T. e Dilbeck P.M. (1995) "Diagnosis of naturally occurring

- bovine viral diarrhoea virus infections in ruminants using monoclonal antibody-based immunohistochemistry" *Vet. Pathol.* 32(6):609-18.
- 3) Baule C., Kulcsar G., Belak K., Albert M., Mittelholzer C., Soos T., Kucsera L. e Belak S. (2001) "Pathogenesis of primary respiratory disease induced by isolates from a new genetic cluster of bovine viral diarrhoea virus type I". *J. Clin. Microbiol.*; 39(1):146-153.
- 4) Bhudevi B. e Weinstock D. (2003) "Detection of bovine viral diarrhoea virus in formalin fixed paraffin embedded tissue sections by real time RT-PCR (Taqman)". *J. Virol. Met.*; 109:25-30.
- 5) Cavarani S. (2002) "La diarrea virale del bovino". Ed. UTET Edizione fuori commercio realizzata esclusivamente per Merial Italia S.p.A. Milano.
- 6) Cavarani S. (1999) "L'aborto infettivo nel bovino. Aspetti eziopatogenetici, criteri diagnostici, considerazione di carattere epidemiologico in allevamenti da latte del nord Italia". *Large anim. rew.*; 5(4):13-24.
- 7) Del Piero F. (2003) "Aborti infettivi dei ruminanti". *Large anim. rew.*; 9(1):11-27.
- 8) Done J.T., Terlecki S., Richardson C., Harkness J. W., Sands J.J., Patterson D.S.P., Sweasey D., Shaw I.G., Winkler C.E. e Duffell S.J. (1980) "Bovine virus diarrhoea-mucosal disease virus: pathogenicity for the fetal calf following maternal infection". *Vet. Record*; 106:473-479.
- 9) Fernandez A., Hewicker M., Trautwein G., Pohlenz J. e Liess B. (1989) "Viral antigen distribution in the central nervous system of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus". *Vet. Pathol.* ;26(1):26-32.
- 10) Fredriksen B., Press C. McL., Løken T. e Ødegaard S.A. (1999) "Distribution of viral antigen in uterus, placenta and foetus of cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus". *Vet. Microbiol.*; 64:109-122.
- 11) Fredriksen B., Press C. McL., Løken T. e Ødegaard S.A. (1999) "Detection of viral antigen in placenta and fetus of cattle acutely infected with bovine viral diarrhoea virus". *Vet. Pathol.*; 36(4):267-275.
- 12) Haines D.M., Clark E.G., e Dubovi E.J. (1992) "Monoclonal antibody-based immunohistochemical detection of Bovine Viral Diarrhoea Virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues". *Vet. Pathol.* ; 29(1):27-32.
- 13) Marcato P.S. "Sistema gastroenterico e peritoneo" in Marcato P. S. "Patologia veterinaria sistematica". Ed. Edagricole Bologna 2002. Pagg. 697-69.
- 13) Marshall D.J., Moxley R.A. e Kelling C.L. (1996) "Distribution of virus and viral antigen in specific pathogen-free calves following inoculation with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus". *Vet. Pathol.*; 33(3):311-8.
- 14) Roeder P.L., Jeffrey M. e Cranwell M.P. (1986) "Pestivirus fetopathogenicity in cattle: changing sequelae with fetal maturation". *Vet. Record*; 118:44-48.
- 15) Shin T. e Acland H. (2001) "Tissue distribution of bovine viral diarrhoea virus antigen in persistently infected cattle". *J. Vet. Sci.*; 2(2):81-84.

Conservazione strutturale

5/5	presenza di tutti gli strati
4/5	mancanza di uno strato (epitelio di superficie; capsula; tonaca sierosa)
3/5	mancanza di due strati o componenti d'organo
2/5	mancanza di tre strati o componenti d'organo (taglio tangente)
1/5	organo non riconoscibile (un solo strato o componente non meglio definibile)

Dettaglio citoplasmatico

5/5	perfetta definizione del materiale citoplasmatico, assenza di alterazioni di membrana
4/5	lievi alterazioni citoplasmatiche, assenza di alterazioni di membrana
3/5	modeste alterazioni citoplasmatiche, visibili alterazioni di membrana
2/5	evidenti alterazioni citoplasmatiche, marcate alterazioni di membrana
1/5	difficile interpretazione del tipo cellulare

Dettaglio nucleare

5/5	perfetta definizione delle caratteristiche morfologiche nucleari
4/5	lievi alterazioni delle caratteristiche nucleari
3/5	modeste alterazioni delle caratteristiche nucleari (es. vacuolizzazioni, alterazioni cromatiniche)
2/5	evidenti alterazioni delle caratteristiche nucleari (es. vescicolazione, margnazione nucleoli)
1/5	caratteristiche nucleari non valutabili

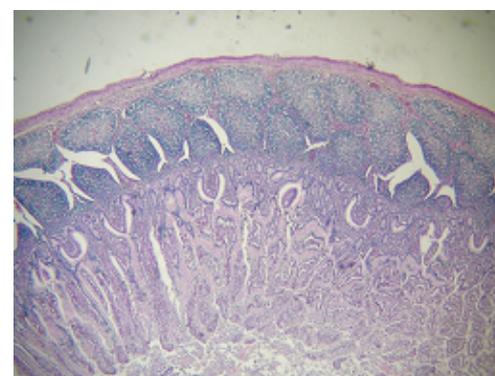


Figura 1. Intestino tenue. Iperplasia e linfangectasia della Placca del Peyer. EE 25X

Tabella 1. Parametri qualitativi dei campioni

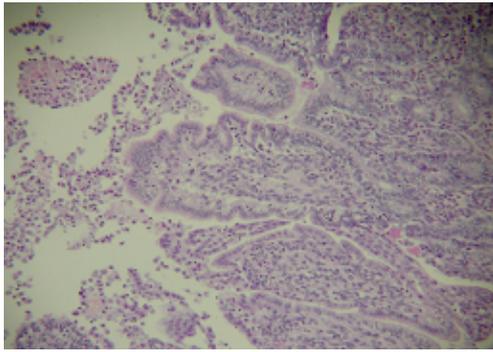


Figura 2. Intestino tenue. Atrofia rigenerativa. EE 200X

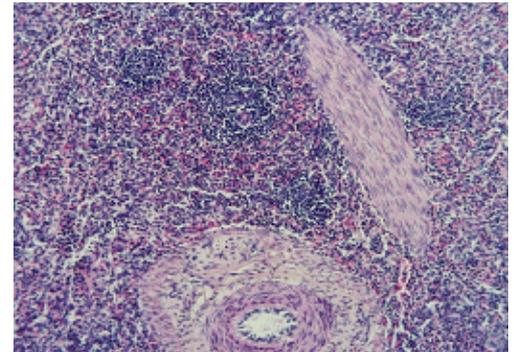


Figura 3. Milza. ipoplasia noduli linfatici. EE 200X

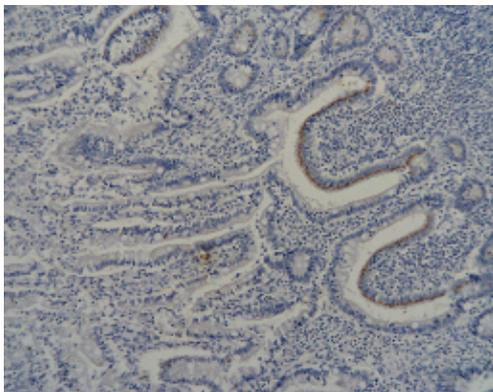


Figura 4. Intestino tenue. Positività delle cellule delle cripte del Lieberkuhn. 100X

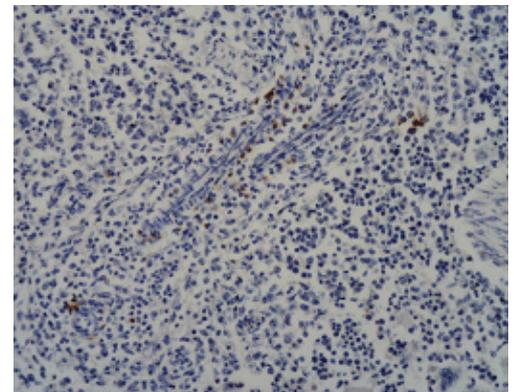


Figura 5. Milza. Positività delle cellule dei manicotti perivascolari. 200X

L'ACCURATEZZA DELL'ESAME ISTOPATOLOGICO E DELLA COLORAZIONE ZIEHL- NEELSEN PER LA DIAGNOSI DI TUBERCOLOSI BOVINA NELL'AMBITO DEI PROGRAMMI DI ERADICAZIONE

Varello Katia, Zoppi Simona, Dondo Alessandro, Ingravalle Francesco, Mascarino Daniela, Bozzetta Elena

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino, Italy

Il netto miglioramento dei dati relativi alla prevalenza della Tuberculosis bovina in Piemonte ha indotto le autorità sanitarie regionali all'applicazione di specifiche misure per conseguire la qualifica di territorio ufficialmente indenne.

Per valutare l'accuratezza dell'esame istopatologico con colorazione ematossilina-cosina (EE) e Ziehl- Neelsen (ZN), quali metodiche previste nell'attuale protocollo diagnostico di conferma di lesioni non classiche rilevate all'esame anatomopatologico, sono stati esaminati 96 lesioni linfonodali sospette di bovini sani positivi ai test intra-vitam. I risultati sono stati confrontati con l'esame batteriologico per *M. bovis* come gold standard. I quadri istopatologici sono stati preventivamente classificati come granuloma tubercolare (tubercolo con caseificazione e mineralizzazione, cellule epitelioidi e giganti del Langhans), lesione non conclusiva (linfadenite granulomatosa con infiltrato cellulare macrofagico e epitelioidi) e negativo (iperplasia linfoide, colonie batteriche nell'ambito di aree necrotiche o infiltrati eosinofili) La positività alla ZN è invece stata attribuita in base al rilievo di uno o più corpi batterici acido-alcool resistenti.

La colorazione EE ha dimostrato una sensibilità del 94.67% che aumenta a 96% se i quadri granulomatosi vengono reinterpretati come positivi, con valore predittivo positivo del 100%, e una specificità del 100%. La colorazione ZN è risultata essere poco sensibile (16%), ma molto specifica (100%).

Questi risultati indicano che l'esame istopatologico con EE applicando i criteri istomorfologici indicati rappresenta uno strumento diagnostico rapido ed efficace sia per la caratterizzazione di lesioni tubercolari tipiche che per individuare quadri microscopici associabili ad altre cause eziologiche.

Parole chiave: Tuberculosis bovina, esame istopatologico, Ziehl-Neelsen, accuratezza.

ACCURACY OF HISTOPATHOLOGY AND ZIEHL-NEELSEN STAINING FOR BOVINE TUBERCULOSIS DIAGNOSIS IN THE FRAME OF ERADICATION PROGRAMMES.

The decreasing prevalence of bovine Tuberculosis in Piedmont led regional authorities to set up specific measures in order to qualify the zone as tuberculosis-free. To evaluate the accuracy of histopathological examination by hematoxylin and eosin (HE) and Ziehl-Neelsen (ZN) staining, as methods foreseen by the diagnostic protocol on suspected lesions in animal reacting positive to ante-mortem tests, 96 samples of lymph nodes belonging to healthy cattle were examined. Results were compared to mycobacterial culture and *M. bovis* identification as reference test. Histopathological changes were preliminary classified as tubercular granuloma (tubercle with epithelioid and Langhans giant cells, caseation or mineralization), inconclusive lesion (granulomatous lymphadenitis with macrophages and epithelioid cells) and negative (lymphoid hyperplasia or presence of bacterial colonies within necrotic area or significant eosinophilic infiltrates). A positive ZN result was recorded for one or more acid fast bacteria detected.

HE sensitivity was 94.67%, raising to 96% when granulomatous lymphadenitis was reviewed as positive, with a positive predictive value of 100%, while the specificity 100%. ZN staining was less sensitive (16 %), but high specific (100%).

Our results suggest that routine histopathology applying the above histomorphologic criteria is a reliable tool for rapid tuberculosis diagnosis in cattle, allowing to identify both typical mycobacterial lesions and microscopic features indicative of another causative etiology.

Key words: bovine Tuberculosis, histopathology, Ziehl-Neelsen, accuracy.

**CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE E FENOTIPICA DI CEPPI DI *LISTERIA MONOCYTOGENES*
ISOLATI DA CASI CLINICI UMANI E DEI RUMINANTI NEL NORD ITALIA**

Pezzolato Marzia, Nappi Raffaella, Grattarola Carla, Iulini Barbara, *Serra Roberto, Bozzetta Elena

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino, Italy

** Ospedale S. Giovanni Battista-SCDO Microbiologia, Torino, Italy*

La sorveglianza delle Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili animali, implementata in tutta Europa in seguito all'epidemia di BSE, ha permesso di accertare come *Listeria monocytogenes* (L. m.) rappresenti la principale causa di sindromi neurologiche nei ruminanti.

Per verificare il ruolo epidemiologico svolto dai ruminanti nella diffusione di ceppi a significato zoonosico, i ceppi di L.m. isolati nel Nord Italia da 18 casi clinici animali e 10 umani dal '98 ad oggi sono stati sottoposti a sierotipizzazione e ribotipizzazione; inoltre, sono stati valutati mediante colorazione ematosilina-eosina e immunistochemica il pattern di distribuzione delle lesioni neuropatologiche e l'immunopositività per *Listeria* spp .

I sierotipi di L.m .isolati dagli animali sono risultati essere 1/2b (3), 4b (14), 4e (1) mentre quelli umani 1/2a (1), 1/2b (6), 4e (1) , 4d (2). La ribotipizzazione ha permesso di distinguere 13 clusters nell'ambito dei quali 2 ribogruppi sono risultati comuni tra uomo e animale.

In tutti gli encefali animali i quadri neuropatologici osservati sono stati classificati come meningoencefaliti linfocitarie, da moderate a gravi, caratterizzate da manicotti perivascolari associati a microascessi e aree di malacia a livello del tronco encefalico, con immunopositività di intensità variabile.

I nostri risultati indicano 1/2b e 4b come i sierotipi più frequentemente coinvolti negli episodi di listeriosi umana ed animale nel Nord Italia.

Inoltre, l'evidenza di due ribogruppi comuni tra uomo e ruminanti evidenzia come questi ultimi potrebbero giocare un importante ruolo epidemiologico sia come serbatoio sia come sorgente di infezione di listeriosi per l'uomo.

Parole chiave: *Listeria monocytogenes*, sierotipizzazione, ribotipizzazione, zoonosi.

**MOLECULAR AND PHENOTYPIC CHARACTERIZATION OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* STRAINS
ISOLATED FROM HUMAN AND RUMINANT CLINICAL CASES IN NORTHERN ITALY**

Surveillance on animal Transmissible Spongiform Encephalopathies, implemented all over Europe following the BSE epidemics, allowed to identify listeriosis as the first cause of neuropathological diseases in ruminants.

To investigate the role of ruminants as possible zoonotic source of listerial strains, isolates obtained in Northern Italy since 1998 from 18 animals and 10 human clinical cases of listeriosis were subjected to serotyping and ribotyping. Furthermore we evaluated the distribution pattern of the neuropathological lesions and the immunopositivity for listerial antigens in ruminants CNSs.

Serotypes isolated from ruminant were 1/2b (3), 4b (14), 4e (1), while from humans 1/2a (1), 1/2b (6), 4e (1) , 4d (2). Ribotyping could distinguish 13 different clusters within the isolates and two common ribogroups between human and animal strains. Light microscopic changes in all ruminants CNSs were represented by moderate to severe meningoencephalitis characterised by mononuclear perivascular cuffs associated with microabscesses and malacic area in the brainstem, with mild to strong immunolabelling in all cases.

Our results indicate 1/2b and 4b as the most important serotypes causing listeriosis in man and ruminants in Northern Italy.

Moreover, the finding of two common clusters within human and animal isolates highlights that ruminants could play an important epidemiological role both as reservoir and source of listerial infection for human beings.

Key words: *Listeria monocytogenes*, serotyping, ribotyping, zoonosis.

**VALUTAZIONE ISTOLOGICA ED IMMUNOISTOCHEMICA DI LESIONI POLMONARI RIFERIBILI A
MYCOPLASMA BOVIS NELLA SPECIE BOVINA**

Radaelli Enrico, Grieco Valeria, Giusti Anna Maria*, Loria Guido Ruggero**, Luini Mario***, Scanziani Eugenio

*Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Sezione di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviare, Facoltà di Medicina Veterinaria, Milano; * Nerviano Medical Sciences, Nerviano (Mi); ** Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, Palermo; *** Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Lodi*

Mycoplasma bovis è considerato l'agente eziologico della "sindrome polmonite cronica-poliartrite del vitello", patologia caratterizzata da flogosi polmonare ed articolare a carattere fibrino-necrotico. Scopo di questo studio è definire ed interpretare dal punto di vista patogenetico le lesioni polmonari in corso di infezione da *M. bovis*.

A tal scopo sono stati considerati 20 bovini con lesioni polmonari dalle quali è stato isolato batteriologicamente *M. bovis*. Campioni di tali lesioni sono stati sottoposti ad esame istologico ed immunoistochimico utilizzando un siero policlonale specifico per *M. bovis*.

L'esame immunoistochimico è risultato positivo in 14 casi caratterizzati da diffusa polmonite fibrinosa (12 casi) e broncopolmonite catarrale (2 casi) con lesioni necrotiche sublobulari, multifocali-confluenti (13 casi). In 12 di questi casi, antigene riferibile a *M. bovis* è stato rilevato alla periferia dei focolai di necrosi ed, in minor quantità, in rapporto a materiale necrotico nel lume di bronchi e bronchioli (7 casi). *M. bovis* è stato pure evidenziato nell'essudato bronco-alveolare (11 casi), occasionalmente localizzato nel citoplasma di macrofagi. Trombosi vasale è stata occasionalmente evidenziata a livello interstiziale (11 casi): tuttavia nessuna positività immunoistochimica è stata repertata a questo livello. I rimanenti 6 casi, contraddistinti morfologicamente da quadri di broncopolmonite catarrale (3 casi), polmonite fibrinosa (1 caso) e polmonite fibrino-necrotica (2 casi), sono risultati negativi all'esame immunoistochimico. I reperti osservati indicano come gravi infezioni da parte di *M. bovis* si associno a tipiche forme di polmonite fibrino-necrotica e come la necrosi polmonare consegua ad azione diretta del patogeno.

Parole chiave: *Mycoplasma bovis*; bovino; polmone; necrosi.

**HISTOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY OF BOVINE LUNG LESIONS INDUCED BY
MYCOPLASMA BOVIS.**

Mycoplasma bovis infection is associated with a variety of bovine diseases including chronic pneumonia-polyarthritis syndrome (CPPS) characterized by fibrinous and necrotizing inflammation of the lung and joints. Aim of this study is to correlate *M. bovis* infection and pathological findings of the lung.

For this purpose, lung samples from 20 calves in which *M. bovis* was isolated were considered. These samples were examined histologically and immunohistochemically by the use of a rabbit polyclonal antibody directed against *M. bovis*.

M. bovis antigen was immunohistochemically detected in 14 cases with diffuse fibrinous pneumonia (12 cases) and catarrhal bronchopneumonia (2 cases), characterized by the presence of sublobular, multifocal to coalescing, coagulative necrotic lesions (13 cases). Large amount of *M. bovis* antigens was detected at the periphery of coagulative necrotic foci (12 cases) and within the necrotic material filling bronchiolar lumina (7 cases). *M. bovis* was also detected in bronco-alveolar exudate (11 cases), occasionally in the cytoplasm of macrophages. Thrombosis of blood interstitial vessels was observed in 11 cases and was not associated with *M. bovis* antigen. The remaining 6 immunohistochemically-negative cases showed catarrhal bronchopneumonia (3 cases), fibrinous pneumonia (1 case) and fibrinous and necrotizing pneumonia (2 cases).

Our results indicate that *M. bovis* infection is associated with a typical fibrinous and necrotizing pneumonia and that the organism has a direct necrotizing effect.

Key words: *Mycoplasma bovis*; bovine; lung; necrosis.

INTRODUZIONE

Mycoplasma bovis è causa, nel bovino, di differenti patologie tra cui la così detta sindrome polmonite cronica-poliartrite (chronic pneumonia-polyarthritis syndrome, CPPS) nel vitello, infezione mammaria e disturbi riproduttivi nella vacca.

Inoltre, con minor frequenza, *M. bovis* si associa ad episodi di otite suppurativa media, ascessi cutanei, meningite fibrinosa, miocardite ed infezioni perlopiù sub-cliniche dell'apparato genitale maschile. I fenomeni di mastite e polmonite rappresentano una problematica attuale in relazione soprattutto all'elevata incidenza con cui si verificano e al conseguente danno recato in termini produttivi. Infatti, nonostante siano stati compiuti notevoli sforzi al fine di definire un idoneo protocollo profilattico e terapeutico, non esiste ad oggi alcuna efficace formulazione vaccinale ed inoltre il patogeno dimostra notevole resistenza in vivo nei confronti di svariate classi di antimicrobici (1, 2, 3).

Dal punto di vista patogenetico, appaiono nondimeno poco chiare le modalità attraverso cui *M. bovis* si relaziona all'ospite bovino. *M. bovis* manifesta una spiccata patogenicità soprattutto a livello polmonare (3, 4), dove mostra alcune analogie morfopatologiche con la pleuropolmonite contagiosa bovina. In entrambe le patologie si osservano, infatti, fenomeni prevalenti di pleuropolmonite fibrinosa associati a lesioni necrotiche a carico del parenchima polmonare (5). Per quanto concerne l'infezione polmonare sostenuta da *M. bovis* risulta inoltre evidente l'implicazione e la responsabilità di meccanismi immuno-mediati nel promuovere la gravità del quadro patologico. Tale fenomeno viene chiamato in causa soprattutto in rapporto ai reperti lesivi di diffusa ed accentuata reattività linfo-reticolare, che si osserva sovente in fase cronica di patologia, e per quanto concerne la genesi delle lesioni necrotiche (6, 7). In tal senso, appare perciò di notevole rilevanza chiarire sia il ruolo svolto dai molteplici fattori di patogenicità propri del microrganismo, sia la complessa cinetica dei relativi meccanismi immunitari difensivi messi in atto dall'ospite bovino. Scopo di questo lavoro è stato quello di definire ed interpretare dal punto di vista patogenetico lesioni polmonari bovine riferibile a *M. bovis*.

MATERIALI E METODI

Nel presente lavoro sono stati considerati 20 bovini con lesioni polmonari dalle quali è stato isolato batteriologicamente *M. bovis*. Campioni provenienti da tali lesioni sono stati fissati in formalina tamponata al 10% ed inclusi in paraffina al fine di ottenere sezioni microtomiche seriate dello spessore di 5 µm. Parte di tali sezioni sono state colorate con Ematossilina-Eosina e periodic acid Schiff (PAS) per la valutazione istologica, parte invece sono state destinate ad esame immunoistochimico secondo il metodo avidina-biotina-perossidasi (ABC) mediante utilizzo di anticorpo primario policlonale, prodotto in coniglio, specifico per *M. bovis*.

RISULTATI

Le lesioni macroscopiche di maggior rilievo interessavano i lobi apicali ed in minor misura i cardiaci e l'azigos. A tale livello il reperto necroscopico maggiormente rilevante era rappresentato da aree localmente estese di consolidamento polmonare color rosso cupo, una tramatura lobulare moderatamente rinforzata e multiple lesioni nodulari biancastre (0,1-1 cm di diametro), da multifocali a confluenti e contenenti, all'interno di una capsula fibrosa più o meno evidente, materiale necrotico dall'aspetto caseoso (Fig. 1).

L'esame istologico ha evidenziato la presenza di quattro distinti modelli morfopatologici riferibili principalmente:

- a. Pleuropolmonite fibrinosa associata alla presenza di lesioni necrotiche (13 casi).
- b. Broncopolmonite catarrale cronica associata alla presenza di lesioni necrotiche (2 casi).
- c. Pleuropolmonite fibrinosa (2 casi).
- d. Broncopolmonite catarrale cronica (3 casi)

I quadri di pleuropolmonite fibrinosa erano caratterizzati da differenti stadi evolutivi (ingorgo, epatizzazione rossa, epatizzazione grigia e carnificazione). L'essudazione alveolo-bronchiolare era prevalentemente rappresentata da abbondante fibrina, associato ad una componente cellulare più o meno evidente costituita da numerosi istiociti, non rari neutrofilii e scarse cellule giganti multinucleate. A carico dei setti interlobulari e degli spazi subpleurici erano presenti alterazioni di circolo (congestione vasale, grave linfangectasia, edema) e scarsa-moderata infiltrazione flogistica diffusa. I quadri di broncopolmonite catarrale cronica erano prevalentemente caratterizzati da imponente iperplasia a carico del tessuto linfoide bronco-associato, grave ispessimento ed infiltrazione linfoplasmacellulare della sottomucosa e della lamina propria, moderati fenomeni di bronchiolite obliterante e scarsa quantità di essudato catarral-purulento nel lume. Tali reperti appaiono morfologicamente compatibili con gli aspetti tipici della così detta *cuffing pneumonia*.

Le aree di necrosi erano composte da materiale eosinofilo a zolle, circondate perifericamente da un vallo di cellule infiammatorie degenerate-necrotiche e reazione fibro-connettivale infiltrata da linfoplasmacellule e macrofagi (Fig. 2). Le aree necrotiche maggiormente estese sembravano evolvere a partire da un iniziale processo di confluenza coinvolgente singoli focolai necrotici a carico di poche unità alveolari o tratti terminali di strutture bronchiolari. In tali casi si evidenziava la presenza di scarso materiale necrotico, frammisto ad abbondanti cellule infiammatorie degenerate-necrotiche ed associato a fibroplasia periferica lieve od assente. Erano inoltre osservabili occasionali estese aree di necrosi morfologicamente sovrapponibili a piccoli sequestri di pleuropolmonite contagiosa bovina (PPCB). All'interno di tali lesioni necrotiche era ancora riconoscibile la principale istoarchitettura del parenchima polmonare. In correlazione alla necrosi parenchimale si repertava spesso materiale necrotico nel lume di bronchi e bronchioli.

L'esame immunostochimico (Grafico 1) è risultato positivo in 14 casi di cui:

- a. Pleuropolmonite fibrinosa associata a focolai necrotici in 11 casi.
- b. Broncopolmonite catarrale cronica associata a focolai necrotici in 2 casi.
- c. Pleuropolmonite fibrinosa in 1 caso.

Contrariamente l'esame immunostochimico è risultato negativo in 6 casi di cui:

- a. Pleuropolmonite fibrinosa associata a focolai necrotici in 2 casi.
- b. Broncopolmonite catarrale cronica in 3 casi.
- c. Pleuropolmonite fibrinosa in 1 caso.

In 12 casi elevate quantità di antigene riferibile a *M. bovis* sono state evidenziate in rapporto alla periferia dei focolai di necrosi parenchimale a livello di interfaccia tra cellule infiammatorie degenerate-necrotiche e zolle di materiale necrotico. In 7 casi è stata inoltre osservata positività immunostochimica in associazione al materiale necrotico all'interno del lume di bronchi e bronchioli. Infine in 11 casi moderate quantità di antigene si evidenziavano a livello di essudato bronco-alveolare (Fig. 3), con occasionale localizzazione all'interno del citoplasma di macrofagi e granulociti neutrofilici.

Attraverso la colorazione di PAS sono stati osservati reperti occasionali di trombosi parietale a carico dei vasi ematici sia venosi che arteriosi in 11 casi.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Dai dati emersi in questo lavoro si può asserire che nel bovino la patologia polmonare sostenuta da *M. bovis* si associa in modo prevalente a quadri morfopatologici di pleuropolmonite fibrino-necrotica. Per quanto concerne la patogenesi delle lesioni di necrosi parenchimale, le ipotesi considerate sono:

- a. Fenomeni di necrosi di tipo ischemico, in analogia con quanto avviene per la genesi dei tipici sequestri che si evidenziano in corso di PPCB.
- b. Azione necrotizzante diretta svolta dal patogeno nei confronti del parenchima polmonare.
- c. Meccanismo immunopatologico scatenato da *M. bovis* in corso di infezione polmonare.

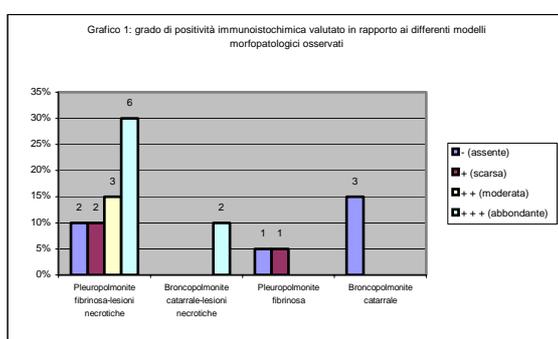
I fenomeni del tutto occasionali di trombosi parietale a carico dei vasi ematici interstiziali non appaiono verosimilmente compatibili con la genesi di lesioni necrotiche di natura ischemica.

Inoltre la tipica distribuzione di *M. bovis* alla periferia dei focolai necrotici è fortemente indicativa di un'azione necrotizzante diretta svolta dal patogeno nei confronti del parenchima polmonare. Tuttavia ad oggi non è stata individuata alcuna sostanza correlata al patogeno in grado di provocare tale effetto istotossico. Inoltre, in analogia con i dati emersi sia dalle numerose sperimentazioni vaccinali (8), sia da modelli murini di infezione sperimentale con *Mycoplasma pulmonis* (9), si specula come l'attivazione di una risposta immunitaria specifica ed altamente integrata si correli positivamente alla gravità del quadro patologico osservato a livello polmonare. In accordo nondimeno con osservazioni che emergono da studi di caratterizzazione della risposta immunitaria in corso di infezione polmonare da *M. bovis* si ipotizza che gli stessi focolai necrotici possano essere determinati da meccanismi immunomediati che vedono coinvolta l'attivazione di un fitto network di citochine proinfiammatorie (IL-1, INF γ , TNF α , NO). Tali mediatori umorali sarebbero responsabili dell'innescamento di processi di apoptosi Fas/Fas ligando-mediata a carico delle strutture epiteliali del parenchima polmonare. L'antigene Fas-CD95, espresso in modo specifico dalle strutture epiteliali sotto stimolazione da parte delle citochine proinfiammatorie, si lega infatti al relativo ligando (CD95 L) presente sulla membrana plasmatica delle stesse cellule infiammatorie implicate nella flogosi polmonare (6).

BIBLIOGRAFIA

1. Thomas A., Mainil J., Linden A. (2003) *Mycoplasma bovis*: synthèse des connaissances actuelles. Ann Méd Vét, 147: 23-39.
2. Nicholas R.A.J. (2004) Recent developments in the diagnosis and control of mycoplasma infection in cattle. XXIII World buiatrics congress, Québec, Canada, 11-16 Juli 2004. Disponibile in: <http://www.ivis.org/proceedings/wbc/wbc2004/wbc2004-Nicholasssimple1.pdf>. Visitato il 16 Aprile, 2005.
3. Loria G.R., Monteverde V., La Barbera E., Caracappa S., Scanziani E., Grieco V., Ayling R., Nicholas R.A.J. (2004) Isolamento di *Mycoplasma bovis* e patologia respiratoria. Large Animals Review, 10 (5): 17-21.
4. Thomas A., Ball H., Dizier I., Trolin A., Bell C., Mainil J., Linden A. (2002) Isolation of *Mycoplasma* species from the lower respiratory tract of healthy cattle and cattle with respiratory disease in Belgium. Vet Rec, 151: 472-476.
5. Scanziani E., Grieco V., Boldini M., Giusti A.M., Luini M., Monoci C., Mandelli G. (1993) Immunostochimical identification of *Mycoplasma bovis* in cases of bovine pneumonia. Atti della società italiana delle scienze veterinarie, 47: 1065-1069.

6. Vanden Bush T.J., Rosenbusch R.F. (2003) Characterization of the immune response to *Mycoplasma bovis* lung infection. *Vet Immunol Immunopathol*, 94: 23-33.
7. Rodriguez F., Sarradell J., Poveda B., Ball H.J., Fernández (2000) Immunohistochemical characterization of lung lesions induced experimentally by *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis* in goats. *J Comp Path*, 123: 285-293.
8. Bryson D.G., Ball H.J., Brice N., Forster F., Pollock D.S. (1999) Pathology of induced *Mycoplasma bovis* calf pneumonia in experimentally vaccinated animals. In: *Mycoplasmas of ruminants: pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics volume 3*, Eds Stipkovits L., Rosengarten R., Frey J., 133-135, European Commission, Brussels.
9. Cartner S.C., Lindsey J.R., Gibbs-Erwin J., Cassel G.H, Simecka J.W. (1998) Roles of innate and adaptive immunity in respiratory mycoplasmosis. *Infect Immun*, 66: 3485-3491.



Graf. 1: Relazione tra grado di positività immunostochimica e differenti modelli morfopatologici osservati. Si nota come elevato grado di positività immunostochimica si associ in modo significativo alla presenza di lesioni necrotiche.



Fig. 1: Aspetto macroscopico di una lesione di necrosi polmonare. Reperto fissato in formalina.

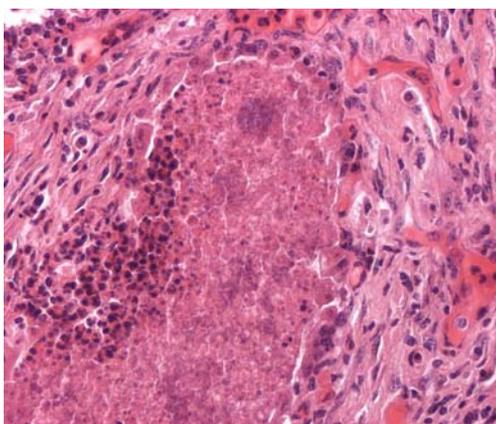


Fig. 2: Aspetto istologico di un'area di necrosi polmonare.

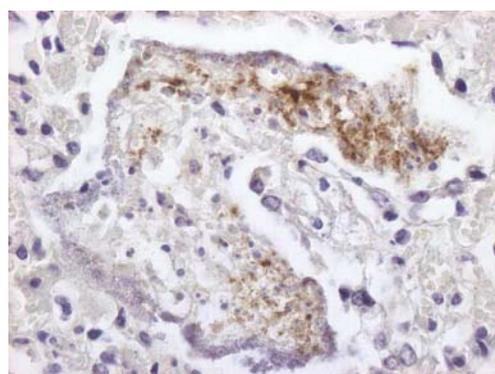


Fig. 3: Presenza di antigene riferibile a *M. bovis* frammito all'essudato alveolare.

MASTITE DA *NOCARDIA ASTEROIDES* NEL BOVINO: REPERTI ISTOLOGICI E VALIDAZIONE DI TEST DIAGNOSTICO IMMUNOISTOCHEMICO

Riccaboni Pietro, Grieco Valeria, Moroni Paolo^o, Piroli Riccardo, Alborali Loris*, Finazzi Mario

Sezione di Anatomia patologica veterinaria e Patologia aviare, ^oSezione di Malattie infettive – DIPAV – Università degli Studi di Milano

**Istituto Zooprofilattico Sperimentale Dell'Emilia e della Lombardia - Brescia*

In un allevamento di 43 bovine in lattazione con conteggi di cellule somatiche storicamente bassi (< 180.000 cell/ml) si è avuta l'improvvisa comparsa di mastiti cliniche. Gli esami batteriologici eseguiti su campioni di latte evidenziarono la presenza di *Nocardia asteroides*. Il ceppo isolato è stato impiegato per la realizzazione di un anticorpo policlonale che ha permesso di approntare una metodica diagnostica immunoistochimica per una rapida diagnosi di nocardiosi direttamente su tessuto. Le colonie di crescita di *N. asteroides*, identificate mediante prove biochimiche ed *API system*, presso i laboratori dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale Dell'Emilia e della Lombardia di Brescia, sono state inoculate in conigli dal cui siero, ottenuto con prelievo di sangue, è stato purificato un anticorpo policlonale diretto contro il ceppo di *Nocardia* inoculato. Da una delle bovine macellate vennero prelevati campioni di tessuto mammario e linfonodale nonché di fegato, rene e polmone. Dai campioni, fissati in formalina ed inclusi in paraffina secondo le tecniche istologiche di routine, sono state ottenute sezioni a loro volta colorate con Ematossilina Eosina, con le colorazioni di Gram e Grocott. Inoltre, è stato eseguito l'esame immunoistochimico con tecnica ABC con l'anticorpo policlonale anti-*N. asteroides*. Per la valutazione della specificità dell'anticorpo sono stati impiegati campioni con lesioni tubercolari ed actinomicotiche. L'esame istologico della mammella ha permesso di riconoscere, accanto ad acini normali, altri completamente occupati da flogosi granulomatosa caratterizzata da massiccia infiltrazione di cellule epitelioidi, meno frequenti cellule giganti e da centro necrotico-purulento talora con presenza di formazioni intensamente acidofile disposte a raggiera, al cui interno le colorazioni di Gram e di Grocott hanno permesso di evidenziare batteri di forma filamentosa. All'esame immunoistochimico i corpi batterici hanno espresso intensa positività in assenza di segnale di fondo. Gli altri organi della stessa bovina non presentavano lesioni riferibili a nocardiosi e, come pure i campioni di controllo negativo, non hanno espresso nessuna positività. Il presente lavoro ha permesso di validare l'uso un anticorpo policlonale utile nella diagnosi rapida di *N. asteroides*. L'indagine immunoistochimica permette infatti di ottenere validi risultati in tempi relativamente brevi, e soprattutto di non essere influenzata da trattamenti antibiotici.

Parole chiave: *Nocardia asteroides*, mastite, bovino, istologia, immunoistochimica.

BOVINE *NOCARDIA ASTEROIDES* MASTITIS: HISTOLOGICAL FINDINGS AND IMMUNOHISTOCHEMICAL DIAGNOSTIC TEST VALIDATION.

In a dairy farm with 43 lactating cows, a suddenly increase in the number of clinical mastitis was detected. Cyto-bacteriological analysis showed a *Nocardia asteroides* infection. By inoculation in rabbit of *N. asteroides* colonies, a serum anti-*N. asteroides* was obtained. Histological severe piogranulomatous mastitis with necrotic foci often containing gram positive bacilli surrounded by a zone of eosinophilic club-shaped structures giving the appearance of rosettes. Immunohistochemically the bacterial body were always positively marked and no other positive signs were detected. With the immunohistochemistry this serum permits to perform a secure and speedy diagnoses of *N. asteroides* infection without any problems due to the antibiotic treatments.

Key words: *Nocardia asteroides*, mastitis, bovine, histology, immunohistochemistry.

INTRODUZIONE

La nocardiosi, è una malattia cronica a carattere piogranulomatoso che può colpire uomo ed animali. La malattia è sostenuta da batteri filamentosi, Gram-positivi, alcuni dei quali acido resistenti, appartenenti al genere *Nocardia*. Nelle varie specie, diverse specie di *Nocardia*, causano differenti patologie: nel bovino la mastite è sostenuta da *Nocardia asteroides*. *N. asteroides* è un batterio opportunisto quasi sempre acido-resistente appartenente all'ordine

Actinomycetales ed alla famiglia *Actinomycetaceae* (Wendt *et al.*, 1968) che viene ben evidenziato con le colorazioni di Gram e Grocott (Fuchs e Boretius, 1972, Marcato, 2002). Il microorganismo è prettamente tellurico e come saprofito può vivere anche nei materiali organici in decomposizione. Normalmente penetra nell'organismo per via orale, inalatoria o attraverso soluzioni di continuo cutanee (Redaelli, 1995); nella mammella, invece, potrebbe penetrare in seguito a scarsa igiene nelle manipolazioni di mungitura o in interventi iatrogeni. Il germe ha crescita lenta e per svilupparsi nella mammella necessita di tempi lunghi che spesso corrispondono all'asciutta. In questa fase si formano i primi focolai che con la montata latte e lo stress del parto, veicolati dal latte stesso, si diffondono nella mammella (Pier *et al.*, 1958, 1961a, 1961b). La mastite da *N. asteroides* è un'infezione generalmente a carattere localizzato, anche se sono descritti rarissimi casi a carattere enzootico grave ed acuto (Marcato, 2002). Nella nocardiosi mammaria si possono riconoscere forme sia acute, sia croniche. Le forme acute si riscontrano soprattutto nel primo mese di lattazione (Marcato, 2002) ed in particolare a ridosso del parto (Kennedy e Miller, 1993). Sono quadri perlopiù molto gravi e nell'ambito di un processo di generalizzazione, oltre ai linfonodi regionali, possono coinvolgere altri organi come il polmone (Kennedy e Miller, 1993). Generalmente è colpito un unico quarto mammario (Marcato, 2002) che appare notevolmente aumentato di volume e di consistenza pastoso-dura, rivestito da cute tesa, sottile e spesso fistolizzata e con gemizio d'essudato purulento, frammisto a materiale lattiginoso in cui sono riconoscibili piccoli grumi biancastri (colonie di microrganismi) (Marcato, 2002; Wendt *et al.*, 1969). Al taglio, l'organo mostra evidenti alterazioni cromatiche dal grigio-rossastro al grigio-giallastro, dovute alla presenza di aree necrotico-purulente e disturbi di circolo (Wendt *et al.*, 1969). Il parenchima ha aspetto lardaceo e consistenza pastosa ed alla pressione cola magma purulento denso (Marcato, 2002). Talvolta si riconoscono piccoli focolai purulenti grigio-giallastri di consistenza cremosa sporgenti sulla superficie di taglio (Wendt *et al.*, 1969). I linfonodi mammari sono tumidi ed estremamente aumentati di volume. All'esame istologico alcuni adenomeri sono colpiti da mastite catarrale acuta con edema ed infiltrazione leucocitaria cui possono associarsi emorragie e necrosi nonché marcata infiltrazione di granulociti neutrofili (Wendt *et al.*, 1969), mentre in altri, la normale architettura è sovvertita dall'infiltrazione di ampie cellule epitelioidi e granulociti neutrofili. Spesso le lesioni sono centrate attorno ad una massa basofila granulosa che si irradia perifericamente e da cui derivano sottili clavette eosinofile. I dotti escretori sono dilatati e ricolmi di detriti cellulari di derivazione epiteliale ed infiammatoria. Sono spesso riconoscibili sottili bastoncelli grampositivi, perlopiù filamentosi e ramificati, visibili in modo ottimale con l'impregnazione argentea di Grocott (Wendt *et al.*, 1969). Le forme croniche sono caratterizzate dalla fibrosi. L'organo è ridotto di volume, duro e ricoperto da cute raggrinzita. Alla palpazione, tuttavia, si possono individuare nodi sporgenti sulla superficie di taglio che si presentano come ascessi tendenti a confluire, incapsulati e contenenti materiale purisimile grigio-giallastro di consistenza asciutta. All'esame istologico, la lesione è contraddistinta da marcata infiltrazione di cellule epitelioidi che circondano i margini interni delle cavità, a loro volta queste sono circondate da un infiltrato infiammatorio multiforme istio-leuco-linfocitario rinchiuso da una marcata proliferazione connettivale. In queste forme possono essere presenti rare cellule giganti (Testi *et al.*, 1982) tipo Langhans (Wendt *et al.*, 1969, Kennedy e Miller, 1993).

Circa la diffusione della mastite da *N. asteroides* nel nostro paese, non esistono dati precisi. Studi americani, stimano che la diffusione di questa forma di mastite sia frequente come quelle da *S. aureus*, da *S. agalactiae* e da *E. coli* (Salman *et al.*, 1982). Il presente lavoro nasce, dopo l'individuazione di un grave focolaio di mastite da *N. asteroides* in una stalla dell'Emilia Romagna, dall'esigenza di creare e validare un test immunoistochimico che permettesse una diagnosi rapida direttamente sul tessuto colpito.

MATERIALI E METODI

In una stalla costituita da 56 bovini di cui 43 in lattazione, dopo un improvviso, quanto significativo incremento delle cellule somatiche nel latte, seguito dall'insorgenza di gravi casi di mastite, sono stati eseguiti esami batteriologici secondo le procedure indicate dalla FIL-IDF. Le colonie ottenute sono state nuovamente isolate su agar-sangue ed identificate come *N. asteroides* mediante prove biochimiche ed API system (Bio-Merieux).

Le colonie di *N. asteroides*, sono state quindi inoculate in conigli dal cui siero di sangue è stato purificato un anticorpo policlonale diretto contro il ceppo di *N. asteroides* precedentemente isolato.

Da una bovina colpita ed inviata alla macellazione, sono stati prelevati campioni di tessuto mammario, linfonodale, nonché epatico, renale e polmonare. Tutti i campioni, fissati in formalina, sono stati inclusi in paraffina e sezionati a 5 µm di spessore. Le sezioni di ciascun campione sono state colorate con Ematossilina-Eosina, per l'evidenziazione delle lesioni eventualmente presenti, e con le colorazioni di Gram e di Grocott per l'evidenziazione di *N. asteroides*. L'indagine immunoistochimica è stata svolta impiegando la metodica avidina-biotina-perossidasi (ABC) (Hsu *et al.*, 1981) impiegando, quale anticorpo primario, l'anticorpo anti-*N. asteroides* appositamente preparato. Dopo prove

preliminari, si è valutato che la diluizione ottimale fosse di 1:60.000. Quali controlli negativi, sono stati impiegati casi con granulomi tubercolari ed actinomicotici.

RISULTATI

A carico di un solo quarto mammario (posteriore destro) erano presenti lesioni piogranulomatose disseminate e talora confluenti, perlopiù centrate attorno a detrito necrotico dove erano evidenti, soprattutto alla periferia, colonie batteriche d'aspetto stellato, circondate da un alone eosinofilo e da una rosa di ampie cellule epitelioidi (Fig. 1). Attorno alla necrosi era inoltre presente un ricco infiltrato infiammatorio costituito da cellule epitelioidi, rare cellule giganti, numerosi granulociti neutrofili ed in minor misura linfociti e plasmacellule. Nelle sezioni riferibili agli altri quarti mammari osservati (anteriore e posteriore sinistro), il quadro era dominato da modici reperti di mastite catarrale, in cui erano tuttavia presenti rari focolai intraalveolari ed intraduttali simili a quelli precedentemente descritti. Negli altri organi esaminati non erano presenti alterazioni patologiche. Le colonie batteriche erano positive alla colorazione di Gram (Fig. 2) ed erano formate da filamenti disposti a raggiera composti da numerosi singoli elementi coccoidi. Queste colonie, morfologicamente riferibili a *N. asteroides*, erano presenti nel detrito necrotico (anche in forma di singoli filamenti) come pure in dotti ed alveoli anche se colpiti solo lievemente. Con la colorazione di Grocott le colonie risultavano sottili filamenti neri, ma meno numerose di quelle osservate con la colorazione di Gram. L'esame immunostochimico ha permesso di evidenziare una positività specifica sui corpi batterici, in assenza di segnale di fondo e di alcuna positività nelle sezioni di controllo negativo. La positività era praticamente sovrapponibile a quella ottenuta con la colorazione di Gram (Fig. 3), con l'aggiunta dell'evidenziazione anche di singoli corpi batterici isolati nel detrito necrotico.

DISCUSSIONE

Le lesioni piogranulomatose osservate sono sovrapponibili a quelle descritte in letteratura in corso di mastite da *N. asteroides* (Pier *et al.*, 1958; Kennedy e Miller, 1993; Marcato, 2002). Nel presente caso sono state osservate cellule giganti come descritto da Wendt *et al.* (1968), ma a differenza di quanto osservato da Pier *et al.* (1958). L'insolita presenza di lesioni, anche se di minor gravità, osservata in altri quarti mammari, potrebbe avere sempre origine iatrogena, ma è ipotizzabile che nei differenti quarti siano state veicolate quantità differenti d'agente patogeno. La colorazione di Gram ha permesso di evidenziare strutture batteriche per morfologia e distribuzione in accordo con la letteratura che descrive *N. asteroides* come batterio Gram positivo (Sforza, 1946; Marcato, 2002), salvo alcuni ceppi negativi (Redaelli, 1995). La colorazione di Grocott ha fornito risultati meno soddisfacenti, evidenziando un numero di colonie decisamente inferiore a quanto osservato con la colorazione di Gram. L'indagine immunostochimica ha fornito buoni risultati in quanto ha permesso di evidenziare nelle lesioni anche singoli corpi batterici in assenza di segnale di fondo.

CONCLUSIONE

L'anticorpo prodotto, s'è dimostrato sensibile e specifico e quindi ha permesso di approntare un test immunostochimico di valido ausilio nella diagnosi di nocardiosi mammaria direttamente su tessuto. Questa indagine è sicuramente più rapida rispetto a quella batteriologica e non è influenzabile da eventuali, quanto probabili, trattamenti farmacologici. Inoltre può permettendo d'analizzare campioni d'archivio consente la realizzazione di studi retrospettivi.

BIBLIOGRAFIA

- Fuchs H.W., Boretius J. (1972) - Pathologie, Diagnose und Pathogenese der durch *Nocardia asteroides* verursachten Rindermastitis - Arch. Exper. Vet. Med., **26**: 683 - 699.
- Hsu S.M., Raine L., Farger H. (1981) - Use of avidinbiotinperoxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures - J. Histochem. Cytochem., **29**: 577 - 580.
- Kennedy D.C., Miller R.B. (1993) - The female genital system - The mammary glands. In: Pathology of domestic animals - Jubb K.V.F., Kennedy P.Cp., Palmer N. vol 3 pagg. 466 - 467, Academic Press, San Diego, USA
- Marcato P.S. (2002) - Ghiandola mammaria. In: Patologia sistematica veterinaria - Marcato P.S. pagg. 1065-66, UTET Torino, Italia.
- Pier A.C., Grey D.M., Fossati M.J. (1958) - *Nocardia asteroides*, a newly recognized pathogen of the mastitis complex. - Am. J. Vet. Res., **19**: 319-331.
- Pier A.C., Mejia M.J., Willers E.H. (1961a) - *Nocardia asteroides* as mammary pathogen of cattle. I. The disease in the cattle and the comparative virulence of 5 isolates. - Am. J. Vet. Res., **22**: 502-517.

- Pier A.C., Willers E.H., Mejia M.J. (1961b) – *Nocardia asteroides* as mammary pathogen of cattle. II. The source of nocardial infection and experimental reproduction of the disease. – Am. J. Vet. Res., **22**: 689-703.
- Pier A.C., Thurston J.R., Larsen A.B. (1968) – A Diagnostic Model for Nocardiosis: Comparative Tests in Cattle with Nocardiosis and Mycobacteriosis. - Am. J. Vet. Res., **29**: 397- 403.
- Redaelli G. (1995) – *Nocardi e Rhodococcus*. In Trattato di malattie infettive degli animali. Farina R., Scatozza F. pagg. 360-364. UTET, Torino, Italia.
- Salman M.D., Bushnell R.B., Pier A.C. (1982) – Determination of sensitivity and specificity of *Nocardia asteroides* skin test for detection of bovine mammary infections caused by *Nocardia asteroides* and *Nocardia caviae*. - Am. J. Vet. Res., **43**: 332-335.
- Sforza M. (1946) – Segnalazioni di mastiti da *Asteroides* e prove di pastorizzazione del latte inquinato con tali germi. – Boll. Soc. Ital. Med. E Igiene trop., **6**: 153-159.
- Testi F., Biolatti B., Mohamed M.H. (1982) – La nocardiosi dello zebù e del bovino. - Bollettino scientifico della facoltà di zootecnia e veterinaria. Università nazionale somala, **3**: 101-114.
- Wendt K., Pospíšil H., Fuchs H.W. (1969) – Die enzootische *Nocardia*-Mastitis durch *Nocardia asteroides* 1st. Mitteilung: Klinik und Pathologie. Monatsh Veterinarmed. **24**: 89-97.

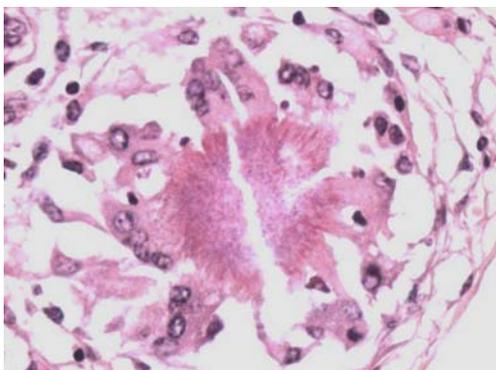


Fig.1 -Bovino - Mammella quarto posteriore destro – Colonia batteriche riferibili a *Nocardia* circondate da cellule epitelioidi - EE 400X.

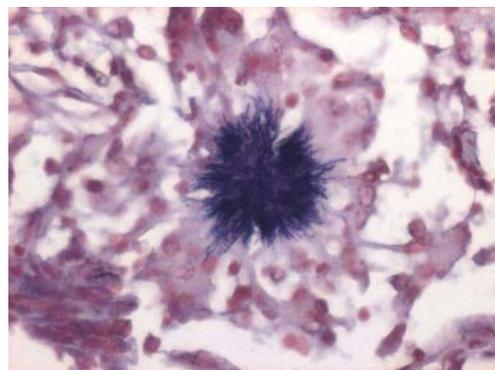


Fig. 2 -Bovino - Mammella quarto posteriore destro – Come in figura 1 con colorazione di Gram 400X.

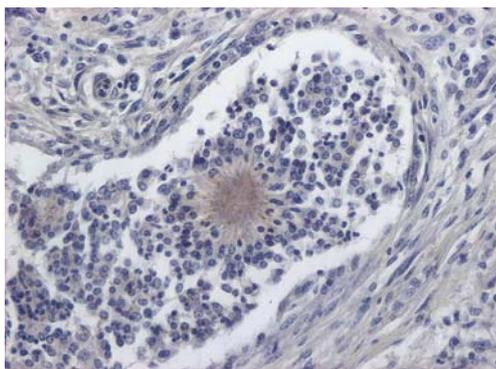


Fig.3 -Bovino - Mammella quarto posteriore sinistro - colonie batteriche riferibili a *Nocardia* in sede intra-alveolare - Immunoperossidasi 200X.

**L'ONCOPROTEINA E5 DEL PAPILOMAVIRUS BOVINO TIPO 2 SI LEGA ED ATTIVA LA SUBUNITÀ β DEL
RECETTORE DEL FATTORE DI CRESCITA DERIVATO DALLE PIASTRINE NEI TUMORI VESCICALI
SPONTANEI DI BOVINI**

Borzacchiello Giuseppe, Russo Valeria, Roperto Sante, Galati Pasquale, Roperto Franco.

*Dipartimento di Patologia e Sanità animale – Sez. ne di Anatomia patologica e Patologia generale – Facoltà di
Medicina veterinaria – Università degli Studi di Napoli “Federico II” – Via F. Delpino, 1 - 80137 – Napoli.*

Le funzioni dell'oncoproteina E5 del Papillomavirus bovino (BPV) sono solo in parte note. In letteratura esistono pochi dati riguardanti le funzioni di E5 *in vivo*; in particolare, i meccanismi molecolari alla base della cancerogenesi epiteliale spontanea mediata da questa oncoproteina virale sono a tutt'oggi sconosciuti.

Questo lavoro dimostra, per la prima volta, che, analogamente a quanto già noto in sistemi sperimentali *in vitro*, l'interazione tra E5 e la subunità β del recettore per il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF β r) si verifica anche in corso di cancerogenesi uroteliale spontanea.

Sono stati esaminati 35 tumori vescicali bovini in cui è stato amplificato, con metodica PCR, il DNA del Papillomavirus bovino tipo 2 (BPV-2). L'espressione del PDGF β r è stata rilevata impiegando un anticorpo anti-PDGF β r gentilmente fornito dal Prof. D. DiMaio (Yale University – USA). Le indagini di microscopia laser confocale mostrano che E5 co-localizza con il PDGF β r nelle cellule tumorali. Inoltre, le due molecole interagiscono fisicamente tra loro come dimostrato da esperimenti di co-immunoprecipitazione. Infine, il PDGF β r associato ad E5 è iperfosforilato nei tumori rispetto alla mucosa normale. Tale risultato indica che il recettore è funzionalmente attivo solo se interagisce fisicamente con E5. Pertanto, poichè il PDGF β r nelle cellule tumorali è fosforilato ed è in complesso molecolare con E5, è verosimile che l'interazione con quest'oncoproteina induca l'attivazione recettoriale mediante dimerizzazione e *trans*-fosforilazione. L'insieme dei dati ottenuti, oltre a sottolineare il ruolo predominante svolto da E5 nella cancerogenesi uroteliale spontanea del bovino, suggerisce che l'interazione fisica tra E5 e PDGF β r è un possibile meccanismo alla base dell'insorgenza dei tumori della vescica. Infine, questo lavoro contribuisce a definire il bovino quale possibile animal model sia per lo studio comparato della patogenesi delle neoplasie papillomavirus associate, sia per la sperimentazione di vaccini terapeutici nell'ospite naturale.

Parole chiave: Oncogene; E5; Papillomavirus bovino tipo-2; PDGF β -r.

Bovine papillomavirus E5 oncoprotein binds to and activates the platelet-derived growth factor β receptor in naturally occurring bovine urinary bladder tumours.

Studies regarding the functions of the Bovine Papillomavirus (BPV) E5 oncoprotein *in vivo* are lacking and no E5 mediated mechanism underlying epithelial carcinogenesis is known. Here we show, for the first time, that the interaction between the platelet-derived growth factor β receptor (PDGF β r) and BPV E5, described *in vitro*, takes place *in vivo* in naturally occurring bovine bladder tumours. 35 bovine bladder cancers were evaluated, by PCR, for BPV-2 DNA. PDGF β r expression was detected with an antibody kindly provided by Prof. D. DiMaio (Yale University – USA). In these cancers, E5 and PDGF β receptor co-localise, as shown by confocal microscopy, and physically interact, as shown by co-immunoprecipitation. Furthermore, the PDGF β receptor associated with E5 is highly phosphorylated suggesting the functional activation of the receptor upon E5 interaction. The PDGF β r is activated in the bladder cancer and, as the activated receptor is complexed with E5, we suggest that the physical interaction with E5 induces receptor dimerisation and *trans*-phosphorylation. Finally, our study validates the cow as a suitable animal model of papillomavirus-associated cancer to test E5 vaccination as a therapeutic device in the natural host.

Key word: Oncogene; E5; Bovine papillomavirus type –2; PDGF β -r.

INTRODUZIONE:

I tumori della vescica urinaria hanno un'incidenza bassa negli animali domestici. Tuttavia, bovini affetti da ematuria enzootica cronica in seguito all'ingestione prolungata di felce, frequentemente sviluppano neoplasie vescicali (Borzacchiello et al., 2003a).

Da tempo è noto che in un'elevata percentuale di tali tumori si amplifica il DNA del Papillomavirus bovino tipo-2 (BPV-2). L'azione sinergica tra virus e principi oncogeni contenuti nella felce nella cancerogenesi vescicale non è ancora del tutto nota.

E5 è la proteina trasformante più importante dei papillomavirus bovini; è espressa negli strati basali degli epiteli (Venuti e Campo, 2002) ed è associata alle membrane dell'apparato di Golgi (Pennie et al., 1993). Molti studi hanno dimostrato che *in vitro* l'oncoproteina E5 induce trasformazione cellulare legandosi ed attivando la subunità β del recettore del fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF β R) (DiMaio and Mattoon, 2001). I dati presenti in letteratura suggeriscono che il recettore si attiva mediante dimerizzazione a seguito dell'interazione con E5 e questo meccanismo media *in vitro* l'azione trasformante di E5 (Drummond-Barbosa et al., 1995). I meccanismi d'azione dell'oncoproteina E5 *in vivo* sono poco conosciuti e non ci sono dati riguardanti i meccanismi molecolari alla base della cancerogenesi epiteliale mediata da questa oncoproteina virale.

In un precedente lavoro condotto da questo gruppo di ricerca, è stato dimostrato che l'espressione di E5 nei tumori vescicali bovini è uno dei fattori causali la cancerogenesi uroteliale (Borzacchiello et al., 2003a).

Questo studio dimostra che l'interazione tra E5 ed il PDGF β R si verifica anche nei tumori vescicali spontanei di bovini.

MATERIALI E METODI:

Sono stati utilizzati 35 campioni di tumori vescicali e 6 campioni di mucosa normale.

Ogni campione è stato diviso in due parti; una parte è stata fissata in formalina neutra al 10% per le indagini istologiche ed immunohistochimiche; l'altra è stata congelata a -80°C per le analisi molecolari.

Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi primari:

anti- PDGF β R #1 (gentilmente fornito dal Prof. D. DiMaio – Yale University – USA)

anti- PDGF β R #2 (Upstate Biotech.)

anti-E5 (gentilmente fornito dal Dr. Schlegel – Georgetown University – USA)

anti- fosfotirosina - clone 4G10 (Upstate Biotech.)

anti- PDGF β R fosforilato in tirosina 1021 (Santa Cruz Biotech.)

anti- β actina bovina (Calbiochem)

La metodologia utilizzata per l'amplificazione del DNA del BPV-2, le indagini istologiche, immunohistochimiche e di doppia colorazione immunofluorescente è quella riportata in Borzacchiello et al., 2003a,b.

Per l'immunoprecipitazione, il lisato è stato preparato incubando per 15 minuti in ghiaccio le dish contenenti 1 ml di RIPA buffer, quindi è stato centrifugato a $12000\times g$ per 10 minuti a 4°C . 800 μl di lisato sono incubati con 2 μl di anti-E5/anti-PDGF β R per 1h e mantenuti in rotazione per favorire il legame antigene-anticorpo. Il lisato è stato unito alla proteina A e incubato per 1h, quindi le beads lavate con RIPA buffer. Infine, il complesso anticorpo primario-antigene è stato staccato dalle beads aggiungendo 30 μl di Laemli buffer 2X e riscaldato ad 80°C .

I campioni sono stati separati mediante elettroforesi su gel a diverse concentrazioni di poliacrilammide in presenza di sodiododecilsolfato. Quindi, le proteine sono state trasferite su filtri di nitrocellulosa. Questi sono stati saturati in soluzione al 5% di albumina serica bovina in TBS-T. Dopo l'incubazione i filtri sono stati lavati ed ibridati overnight con i diversi anticorpi primari. Successivamente i filtri sono stati lavati ed incubati con l'anticorpo secondario coniugato con perossidasi. Le proteine sono state visualizzate mediante chemiluminescenza e l'analisi quantitativa delle bande proteiche evidenziate è stata effettuata mediante NIH Image program, accessibile all'indirizzo web: <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>.

RISULTATI:

Amplificazione del DNA del BPV-2:

La presenza del BPV-2 è stata accertata mediante PCR utilizzando un set di primers che amplificano un frammento di 311 paia di basi comprendente quasi tutta la regione codificante di E5. In 20 tumori su 35 è stato amplificato il DNA del BPV-2; una minore incidenza è stata riscontrata nei campioni di mucosa normale (3 casi su 10 positivi).

Gli ampliconi sequenziati hanno indicato che il genotipo virale corrisponde al BPV-2.

Espressione del PDGF β R:

3 campioni di tumore BPV-2 positivi ed un campione di mucosa normale sono stati analizzati per verificare biochimicamente l'espressione del PDGF β R.

Tali campioni sono stati sottoposti ad immunoprecipitazione con l'anticorpo anti-PDGF β R #1 ed esaminati per Western blotting con un anticorpo commerciale # 2. Sia nei campioni tumorali che nella mucosa normale è stata rilevata

una banda del peso molecolare atteso (Fig.1). L'analisi densitometrica non ha rilevato differenze quantitative nell'espressione del recettore tra mucosa normale e tumori.

Invertendo l'ordine dei due anticorpi sono stati ottenuti risultati pressochè identici.

Il PDGF β R colocalizza con E5 nelle cellule uroteliali neoplastiche:

Il 90% dei tumori esaminati ha mostrato un'immunoreattività positiva all'anticorpo anti-PDGF β R #1 (Fig.2A-C). I risultati sono esposti nella Tabella 1.

6 campioni di tumori e mucosa normale positivi al PDGF β R sono stati valutati per verificare una possibile co-localizzazione del PDGF β R ed E5.

I risultati indicano che il recettore e l'oncoproteina co-localizzano nelle cellule uroteliali neoplastiche mentre la mucosa normale esprime soltanto il PDGF β R. Sorprendentemente, entrambi le proteine sono localizzate in posizione juxtannucleare (Fig.2D-F).

Il PDGF β R interagisce fisicamente con E5:

Per verificare che il PDGF β R fosse in complesso molecolare ed E5, gli stessi lisati proteici dei campioni esaminati per l'espressione del recettore (Fig.1) sono stati immunoprecipitati sia con l'anticorpo anti-E5 che con quello anti-PDGF β R. Gli immunoprecipitati sono poi stati ibridati per Western blotting sia con l'anticorpo anti-PDGF β R che con quello anti-E5.

I risultati ottenuti indicano chiaramente che E5 ed il PDGF β R sono in complesso molecolare stabile nei tumori e non nella mucosa normale (Fig.3). Inoltre, l'analisi densitometrica ha

rivelato che oltre l'80% del PDGF β R totale è in complesso molecolare con l'oncoproteina virale.

Il PDGF β R in complesso molecolare con E5 è iperfosforilato nel cancro:

Per verificare l'attivazione recettoriale gli immunoprecipitati dei campioni tumorali e di mucosa normale sono stati ibridati per Western blotting con un anticorpo anti-fosfotirosina (p-Tyr).

Sia nei tumori che nella mucosa normale è stata rilevata una banda del peso molecolare atteso. L'analisi densitometrica ha rivelato che il PDGF β R è iperfosforilato nel cancro rispetto alla mucosa normale (Fig.4). Per verificare che le bande ottenute fossero quelle specifiche, la membrana è stata "strippata" e reibridata con l'anti-PDGF β R #1. Per determinare se il recettore fosforilato fosse quello in complesso molecolare con E5, i campioni immunoprecipitati con l'anticorpo anti-E5 sono stati ibridati per Western blotting con l'anticorpo anti-fosfotirosina ottenendo gli stessi risultati. Ciò dimostra che il PDGF β R iperfosforilato nel cancro è in complesso molecolare con E5.

Infine, è stata effettuata un'indagine immunostochimica con lo stesso anticorpo anti-fosfotirosina e con un'anticorpo specifico per il PDGF β R fosforilato in corrispondenza della tirosina 1021 (Tabella 1).

I risultati indicano che mentre poche cellule dell'urotelio normale si colorano, i campioni di tumore mostrano una diffusa e più forte immunoreattività (Fig.5). Infine, il 50% dei casi in cui si riscontra un'elevata espressione del PDGF β R mostra anche un'elevata espressione di fosfotirosina, indice dell'aumentata attività tirosin-chinasica.

DISCUSSIONE:

Precedenti lavori condotti da questo gruppo di ricerca hanno dimostrato che non solo c'è un'elevata correlazione tra la presenza di DNA di BPV-2 e tumori della vescica urinaria di bovini, ma che il virus gioca un ruolo fondamentale nella cancerogenesi giacchè esprime E5, la sua maggiore proteina trasformante (Borzacchiello et al., 2003a).

I dati presentati in questo lavoro indicano che E5 ed il PDGF β R colocalizzano in posizione juxtannucleare, in accordo con la localizzazione di E5 nell'apparato di Golgi (Pennie et al., 1993); E5 co-precipita con il PDGF β R indipendentemente se si utilizza un anticorpo anti-E5 o anti-PDGF β R; il PDGF β R è iperfosforilato nei tumori rispetto alla mucosa normale; infine, il PDGF β R fosforilato è in complesso molecolare con E5.

Questi risultati supportano e rafforzano il ruolo svolto dall'oncoproteina virale nella cancerogenesi uroteliale spontanea perché dimostrano che E5 ed il PDGF β R fosforilato formano un complesso molecolare stabile nelle cellule tumorali.

CONCLUSIONE:

A tutt'oggi, lo studio della biologia dei papillomavirus bovini riveste un ruolo fondamentale in patologia comparata per la possibilità di estendere le nozioni acquisite alle corrispondenti patologie umane (Campo et al., 2002).

Il presente lavoro oltre a validare *in vivo* un meccanismo molecolare studiato in sistemi artificiali, contribuisce a definire il bovino affetto da neoplasia vescicale BPV-2 associata quale modello animale di cancerogenesi uroteliale spontanea.

Tale modello animale è utile sia per lo studio *in vivo* dei meccanismi eziopatogenetici delle neoplasie indotte da papillomavirus sia per lo sviluppo di vaccini terapeutici da utilizzare per la cura delle corrispondenti neoplasie dell'uomo.

BIBLIOGRAFIA:

Borzacchiello G, Iovane G, Marcante ML, Poggiali F, Roperto F, Roperto S and Venuti A. (2003a). *J. Gen. Virol.*, **84**, 2921-2926.
 Borzacchiello G, Ambrosio V, Galati P, Perillo A and Roperto F. (2003b). *Vet. Pathol.*, **40**, 455-459.
 Campo MS. (2002). *Virus Res.*, **89**, 249-261.
 DiMaio D and Mattoon D. (2001). *Oncogene* **20**, 7866-7873.
 Drummond-Barbosa DA, Vaillancourt RR, Kazlauskas A and DiMaio D. (1995). *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 2570-2581.
 Pennie WD, Grindlay GJ, Cairney M and Campo MS. (1993). *Virology*, **193**, 614-620.
 Venuti A and Campo MS. (2002). *The E5 protein of papillomavirus. In Human Papillomavirus - Perspectives in Medical Virology*, Edited by D. McCance, **8**, pp.143-164. Amsterdam: Elsevier Science B.V.

Campioni	Diagnosi istopatologica	BPV-2 DNA	Espressione del PDGFβ-R	Espressione di pTyr/pPDGFβ-R	Colocalizzazione E5- PDGFβ-R	Interazione E5- PDGFβ-R
N1	Mucosa normale	+	+++	0	na	na
N2	Mucosa normale	+	+++	0	na	na
N3	Mucosa normale	+	++	+	na	na
N4	Mucosa normale	0	+++	+	na	na
N5	Mucosa normale	0	+++	+	na	na
N6	Mucosa normale	0	++	0	na	na
T1	Displasia grave	++	++	+	nd	nd
T2	Carcinoma in situ	++	+++	+++	nd	nd
T3	Carcinoma in situ	+++	++	++	nd	nd
T4	Carcinoma in situ	++	+++	+++	+++	+++
T5	Ca. Uroteliale carcinoma	++	++	++	nd	nd
T6	Ca. Uroteliale	++	0	0	nd	nd
T7	Ca. Uroteliale	+++	+++	+++	+++	nd
T8	Ca. Uroteliale	+++	+++	+++	+++	nd
T9	Ca. Uroteliale	++	+	+/0	nd	nd
T10	Ca. Uroteliale	+++	++	++	nd	nd
T11	Ca. Uroteliale	+	0	0	nd	nd
T12	Ca. Uroteliale	+++	++	+++	nd	nd
T13	Ca. Uroteliale	+++	++	+++	nd	nd
T14	Ca. Uroteliale	+++	+	+	nd	nd
T15	Ca. Uroteliale	+++	+++	+++	+++	+++
T16	Ca. Uroteliale	+++	++	++	nd	nd
T17	Ca. Uroteliale	+++	+++	+++	+++	nd
T18	Ca. Uroteliale	+++	+++	+++	nd	nd
T19	Ca. Uroteliale	+++	++	++	nd	nd
T20	Adenocarcinoma	+++	+++	+++	+++	+++

Tabella 1. Presenza di DNA di BPV-2 ed espressione del PDGFβ-R nell'urotelio normale e neoplastico. L'intensità degli ampliconi, dell'immunoreattività e delle bande di Western blotting è stata calcolata con una scala da 0 a +++: 0: corrisponde a segnale assente o molto debole; +: segnale debole; ++: segnale moderato; +++: segnale forte. N, mucosa normale; T: tumore; nd: non determinato; na: non applicabile.



Fig.1 Espressione del PDGFβ-R. T4,T15, T20 ed N2 corrispondono ai campioni riportati in Tabella 1. La freccia sulla destra indica le bande del peso molecolare atteso. In un blot parallelo, la stessa quantità di lisato è stata ibridata con un anticorpo anti-βactina bovina per verificare la quantità di proteine caricate.

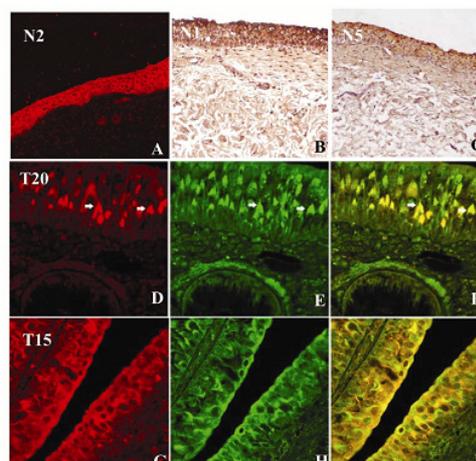


Fig.2. Il PDGFβ-R colocalizza con E5 nelle cellule uroteliali neoplastiche. T4,T15,T20 ed N2: corrispondono ai campioni riportati in Tabella 1. A-C il PDGFβ-R è espresso sia nelle cellule epiteliali che nel mesenchima di urotelio normale BPV-2 positivo e negativo (N5).X120.D-F e G-I l'immunofluorescenza rossa (TRITC) corrisponde al PDGFβ-R, l'immunofluorescenza verde (FITC) a E5, il colore giallo mostra la co-localizzazione delle due molecole. Le frecce indicano la localizzazione JUXTANUCLEARE DEL COMPLESSO MOLECOLARE.X120.

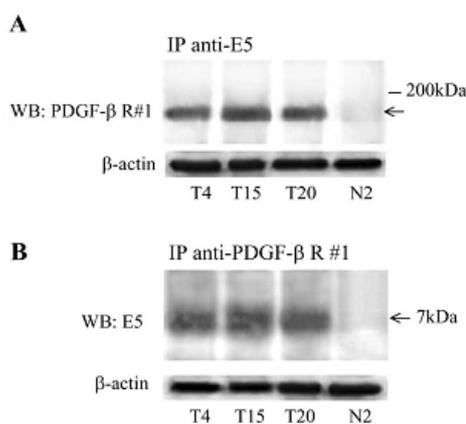


Fig.3. Il PDGFβ-R co-precipita con E5 nel cancro della vescica. T4,T15, T20 ed N2 corrispondono ai campioni come in Tabella 1; A. Il PDGFβ-R è immunoprecipitato dall'anticorpo anti-E5 e l'immunoblot è rivelato con l'anti- PDGFβ-R #1. La freccia sulla destra indica le bande del peso molecolare atteso.In un blot parallelo, la stessa quantità di lisato è stata ibridata con un anticorpo anti-βactina bovina per verificare la quantità di proteine caricate. B. Gli immunoprecipitati della Fig.1 sono poi stati analizzati con l'anticorpo anti-E5. La freccia sulla destra indica le bande del peso molecolare atteso.In un blot parallelo, la stessa quantità di lisato è stata ibridata con un anticorpo anti-βactina bovina per verificare la quantità di proteine caricate.

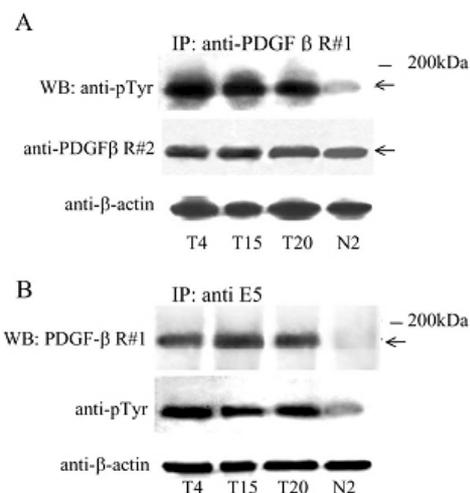


Fig. 4. Il PDGFβ-R è iperfosforilato ed associato ad E5 nel cancro. T4,T15, T20 ed N2 corrispondono ai campioni riportati in Tabella 1; A. Gli stessi immunoprecipitati della Fig.3 sono stati analizzati per Western blotting con l'anticorpo anti-fosfotirosina. La freccia sulla destra indica le bande del peso molecolare atteso. In un blot parallelo, la stessa quantità di lisato è stata ibridata con un anticorpo anti-βactina bovina per verificare la quantità di proteine caricate. B. Gli stessi immunoprecipitati della Fig.3A sono stati analizzati per Western blotting con l'anticorpo anti- PDGFβ-R#1 e l'anticorpo anti-fosfotirosina. La freccia sulla destra indica le bande del peso molecolare atteso.In un blot parallelo, la stessa quantità di lisato è stata ibridata con un anticorpo anti-βactina bovina per verificare la quantità di proteine caricate.

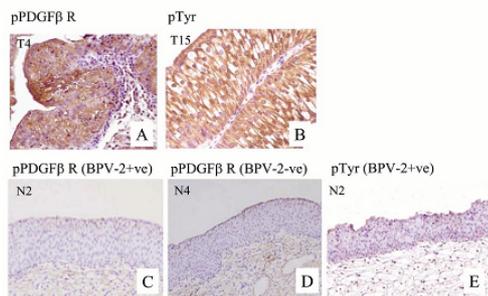


Fig.5. Il PDGFβ-R è fosforilato nel cancro della vescica. T4, T15, N2 ed N4: corrispondono ai campioni riportati in Tabella 1.
A. Tutte le cellule uroteliali neoplastiche mostrano una forte immunoreattività citoplasmatica per il PDGFβ-R fosforilato (pPDGFβ-R) impiegando un anticorpo che riconosce specificamente il recettore con tirosina fosforilata in posizione 1021.X120.
B. Risultati sovrapponibili a quelli sopra riportati si ottengono impiegando un anticorpo anti-fosfotirosina (p-Tyr). X120.
C-D. Nell'urotelio normale BPV-2 positivo o negativo si riscontra una debole immunoreattività in alcune cellule degli strati più superficiali per il pPDGFβ-R.X120.
E. Risultati simili si ottengono colorando l'urotelio normale con un anticorpo anti-fosfotirosina.X120.

**INFLUENZA DELLO STRESS DA TRASPORTO SULLE SOTTOPOPOLAZIONI LINFOCITARIE DEL
VITELLO DA CARNE**

Riondato Fulvio, Miniscalco Barbara, D'angelo Antonio, Bellino Claudio, Guglielmino Roberta.

Dipartimento di Patologia Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Torino.

Ai fini di rilevare le conseguenze del trasporto sulle sottopopolazioni linfocitarie nel sangue periferico, 24 vitelli Blonde D'Aquitaine, maschi, 6 mesi di età, 300 kg di peso, trasportati per 950 km e 14 ore, sono stati sottoposti a prelievo di sangue prima del caricamento sull'autotreno (T0), subito dopo l'arrivo (T1), 24 ore (T2) e 7 giorni dopo l'arrivo (T3). Per ogni prelievo sono stati eseguiti l'esame emocromocitometrico e l'analisi citofluorimetrica delle sottopopolazioni linfocitarie, caratterizzate tramite gli anticorpi monoclonali diretti contro gli antigeni: CD3, TCR $\gamma\delta$, CD21, MHCII (VMRD) e CD2, CD5, CD4, CD8, CD45 (SEROTEC).

Al T0 si è rilevato un conteggio leucocitario elevato ($10442/\mu\text{l}\pm 2986$) conseguente a neutrofilia ($5417/\mu\text{l}\pm 3125$), valori ulteriormente aumentati al T1 ($12279/\mu\text{l}\pm 3200$; $6816/\mu\text{l}\pm 3195$). Al T2 si è riscontrato un ritorno a valori normali ($8687/\mu\text{l}\pm 2667$; $2385/\mu\text{l}\pm 1327$). I linfociti sono sempre rimasti entro i limiti di normalità, con tendenza ad aumentare dopo il trasporto. Il rapporto N:L è passato da 1,3 (T0 e T1) a 0,4 (T2 e T3).

Al T1 si è rilevata una riduzione percentuale statisticamente significativa di tutti i marker di linea T, seguita al T2 da un ritorno ai valori precedenti. In conseguenza del progressivo aumento dei linfociti totali, la riduzione in T1 è poco evidente in numero assoluto, mentre risulta significativo l'aumento in T2. I linfociti B CD21+, invariati al T1, hanno riportato una riduzione relativa in T2 e T3, non associata a variazioni in valore assoluto. L'espressione dell' MHC-II è risultata aumentata a partire dal T1, evidenziando un'attivazione linfocitaria.

In conclusione, dopo il trasporto si osserva una riduzione non selettiva (rapporto CD4:CD8 invariato) dei linfociti T; già 24h dopo si rileva normalizzazione dell'emogramma e dei subset linfocitari. Il mancato incremento dei linfociti B CD21+, lascia presupporre l'aumento di qualche sottopopolazione non identificata dai monoclonali da noi impiegati.

Parole chiave: bovino, sottopopolazioni linfocitarie, stress da trasporto.

EFFECTS OF ROAD TRANSPORTATION ON LYMPHOCYTE SUBSETS IN CALVES.

The effect of transportation (950 km, 14 hours) on peripheral blood lymphocyte subsets in 24 calves (Blonde D'Aquitaine, males, 6 months old, 300 kg b.w.) was investigated. Blood was collected before departure (T0), on arrival (T1), at 24h (T2) and one week (T3) after arrival. Lymphocyte subpopulations were characterized by flow-cytometry using monoclonal antibodies against the following antigens: CD3, TCR $\gamma\delta$, CD21, MHCII (VMRD) and CD2, CD5, CD4, CD8, CD45 (SEROTEC).

High WBC and neutrophil counts were evident at T0 and higher at T1, while the CBC returned to normal values at T2. Lymphocyte count remained in the reference range, with lower values at T0 and higher values at T3. The N:L ratio shifted from 1.3 (T0 and T1) to 0.4 (T2 and T3).

The percentages of all T subsets resulted lowered at T1 and increased to normality at T2. Because of the increasing lymphocyte count, the reduction in T1 was not significant as absolute count, while the increase at T2 was significant. B CD21+ lymphocytes showed a relative decrease at T2 and T3. MHC-II positive cells increased starting from T1.

Transportation led to a non-selective reduction (CD4:CD8 ratio still unaltered) of T subsets that disappeared 24 hours after, when the hemogram was normalized too. The relative loss of T-cells without an increase in B-cell percentage at T1 suggests increasing of some other subpopulation.

Key words: cattle, lymphocyte subsets, stress, transportation.

EFFETTI DELL'AGP BOVINA SULL'APOPTOSI DI MONOCITI IN CULTURA

Pocacqua Vanessa, Cecilianì Fabrizio, Miranda Alba, Bronzo Valerio, Sartorelli Paola

Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Milano, Via Celoria 10, 20133 Milano.

L' α 1-glicoproteina acida (AGP) è una proteina plasmatica di fase acuta la cui funzione è duplice: immunomodulazione dell'attività infiammatoria e trasporto di piccole molecole idrofobiche. Lo scopo del presente lavoro è verificare la potenziale attività pro- o anti- apoptotica dell'AGP bovina. A tal fine, il primo passo è consistito nella purificazione della proteina da sangue intero di bovino che si è ottenuta mediante tre differenti passaggi cromatografici. Il primo ha previsto l'utilizzo di una colonna a scambio anionico seguita da una cromatografia a scambio cationico, mentre l'ultimo step della procedura è stato effettuato con una colonna RP-HPLC (C-4 column). La proteina è stata, quindi, utilizzata su monociti isolati a partire da sangue bovino mediante la tecnica delle Magnetic Activated Cell Sorting (MACS, Miltenyi Biotech.).

L'effetto dell'AGP sull'apoptosi dei monociti è stato studiato utilizzando come modello l'attività di induzione dell'apoptosi da parte della Staurosporina. L'attività apoptotica è stata quantificata mediante un saggio di attività delle caspasi 3/7.

I risultati ottenuti hanno permesso di chiarire che concentrazioni di AGP pari a quelle che si possono riscontrare durante una fase acuta inducono un incremento dell'attività di apoptosi del 50%, mentre concentrazioni di AGP pari a quelle fisiologiche non hanno alcun effetto.

Questo risultato suggerisce che uno dei vari meccanismi di azione alla base dell'attività anti infiammatoria dell'AGP bovina potrebbe essere quello di accelerare la velocità di apoptosi delle cellule immunitarie.

Per confermare la struttura della proteina purificata si è, inoltre, reso necessario il sequenziamento dell'AGP bovina la cui sequenza era, fino ad oggi, sconosciuta. Si è eseguita la predizione della sua struttura terziaria e la sequenza è stata depositata in banca dati con il seguente numero di accesso: AJ844606.

Parole chiave: AGP bovina, monociti, apoptosi.

α 1-ACID GLYCOPROTEIN (AGP) ACTIVITY ON BOVINE MONOCYTES.

α 1-acid glycoprotein (AGP) is an immunomodulatory protein expressed by hepatocytes in response to the systemic reaction that follows tissue damage caused by inflammation, infection or trauma. AGP is a minor acute phase protein in bovines, and its concentration is increased during chronic inflammatory conditions. The aim of this study is try to understand if bAGP has a pro- or anti- apoptotic function on monocytes.

First of all, we purify bAGP by means of three different chromatographic steps: the first one with an anionic chromatography followed by a cationic chromatography. The last step of the procedure was a RP-HPLC (C-4 column). Monocytes were purified using Magnetic Activated Cell Sorting (MACS, Miltenyi Biotech.) and then cultured. Apoptosis was induced with Staurosporin and, in the same time, cells were treated with bAGP in three different concentration. Apoptosis was evaluated by caspases 3/7 assay. Our results suggest that bAGP in acute phase concentration raises apoptosis up to 50% while physiological concentration has no effects.

Key words: bAGP, monocytes, apoptosis.

INTRODUZIONE

L' α 1-glicoproteina acida (AGP) è una proteina plasmatica di fase acuta la cui funzione è duplice: immunomodulazione dell'attività infiammatoria e trasporto di piccole molecole idrofobiche.

Le attività immunomodulatorie, fino ad ora caratterizzate, dell'AGP inducono ad ipotizzare una funzione di tipo anti- infiammatorio. L'AGP è, infatti, in grado di indurre l'espressione di citochine anti- infiammatorie oppure di down regolare l'espressione di citochine pro- infiammatorie da parte delle cellule bersaglio.

Allo stato attuale la capacità dell'AGP di modulare l'apoptosi non è stata ancora studiata.

Lo scopo del presente lavoro è stato di verificare la potenziale attività pro- o anti- apoptotica dell'AGP bovina nei confronti di monociti.

Il protocollo sperimentale messo a punto ha previsto la purificazione all'omogeneità dell' AGP e la purificazione dei monociti.

Associazione Italiana di Patologia Veterinaria

I monociti sono stati, quindi, indotti sperimentalmente ad andare in apoptosi mediante staurosporina e si è valutata l'attività dell'AGP aggiungendo la proteina a diverse concentrazioni.

Per confermare, poi, la struttura della proteina purificata si è reso necessario il sequenziamento dell'AGP bovina la cui sequenza era, fino ad oggi, sconosciuta.

MATERIALI E METODI

Il campione di partenza era sangue intero di bovino; dopo centrifugazione a 900 x g per 15 minuti il plasma è stato recuperato e successivamente dializzato.

La purificazione della proteina si è ottenuta mediante tre differenti passaggi cromatografici. Il primo ha previsto l'utilizzo di una colonna a scambio anionico utilizzando colonne Hi Trap Q Sepharose; la cromatografia è iniziata con l'equilibramento della colonna con dieci volumi di tampone di corsa che è citrato fosfato 10 mM pH 4.0, dopodiché si è caricato il campione e si è atteso che tutto quello non legato dalla colonna, detto volume vuoto, venisse eluito. Per ogni cromatografia a scambio anionico sono stati caricati circa 20 mg di proteine totali.

Le proteine adsorbite sulla resina si sono eluite mediante citrato fosfato 100 mM pH 4.0.

Il secondo passaggio ha previsto una cromatografia d'affinità usando eparina come ligando. La bAGP non si è legata alla resina contenente eparina ed è stata eluita nel volume vuoto, mentre le altre proteine plasmatiche sono state trattenute dalla colonna.

L'ultimo passaggio della procedura è stato effettuato con una colonna a fase inversa Sephasil Protein C4 e la cromatografia è stata eseguita in gradiente continuo da 0 a 100% di acetonitrile in 30 minuti. Il grado di omogeneità della proteina si è valutato mediante SDS-PAGE mentre la contaminazione da parte di endotossine è stata verificata utilizzando il LAL (Limulus amaebocyte) test.

Per l'isolamento dei monociti da sangue bovino si è eseguita la tecnica delle Magnetic Activated Cell Sorting (MACS, Miltenyi Biotech.). Questo protocollo utilizza degli anticorpi anti CD14 legati covalentemente con particelle magnetizzate di ferro di circa 1 nm di diametro. Gli anticorpi riconoscono le cellule d'interesse, che nel nostro caso sono le cellule CD14⁺, e le legano marcandole magneticamente.

Le cellule così marcate vengono isolate da quelle non marcate mediante una colonna inserita in un campo magnetico.

La popolazione cellulare che è stata utilizzata per gli esperimenti di stimolazione si è risospesa in terreno RPMI + 1% FCS (fetal calf serum) alla concentrazione di 10⁵cell/100 \square l. Le cellule sono state seminate in piastre da 96 pozzetti in numero di 10⁵ cellule per pozzetto, fatte aderire over-night e successivamente stimulate con concentrazioni di AGP pari a quelle fisiologiche (0.3 mg/ml) e di fase acuta (1.5 mg/ml). L'effetto dell'AGP sull'apoptosi dei monociti è stato studiato utilizzando come modello l'attività di induzione dell'apoptosi da parte della Staurosporina.

Come controllo negativo è stata utilizzata albumina, purificata mediante cromatografia a fase inversa, ad una concentrazione identica a quella dell'AGP.

L'attività apoptotica è stata quantificata mediante un saggio di attività delle caspasi 3/7.

Per quanto concerne il sequenziamento dell'AGP bovina, l' mRNA è stato estratto da un campione di fegato bovino mediante il kit RNeasy (QIAGEN).

La retrotrascrizione è avvenuta utilizzando il KIT Ready-to-Go You Prime First-Strand Beads (Amersham).

RISULTATI

Il protocollo di purificazione dell'AGP messo a punto ha garantito l'ottenimento della proteina in forma omogenea. Inoltre, l'ultimo passaggio cromatografico a fase inversa, ha assicurato un ulteriore risultato, indispensabile quando si purifica una proteina per testare la sua attività su colture cellulari: la colonna a fase inversa ha infatti eliminato tutti i lipopolisaccaridi (LPS) presenti nella soluzione.

La figura 1 illustra i risultati della procedura di purificazione della bAGP.

Per quello che riguarda la parte di purificazione delle cellule CD14⁺, la tecnica utilizzata ha permesso di ottenere una elevata quantità di cellule, di un ordine di grandezza assolutamente sufficiente per condurre tutti gli esperimenti, in un lasso di tempo ragionevole, tale da ridurre al minimo l'attivazione basale dei monociti, cellule estremamente attivabili da questo punto di vista.

Per quanto concerne l'attività di modulazione dell'apoptosi da parte della bAGP, i risultati degli esperimenti condotti sui monociti purificati vengono illustrati nella figura 2: concentrazioni di AGP pari a quelle che si possono riscontrare durante una fase acuta inducono un incremento dell'attività di apoptosi del 50%, mentre concentrazioni di AGP pari a quelle fisiologiche non hanno alcun effetto.

Il trattamento parallelo dei monociti utilizzando come controllo negativo l'albumina, non ha evidenziato alcun cambiamento significativo rispetto ai controlli. Il risultato dell'apoptosi suggerisce che uno dei vari meccanismi di azione alla base dell'attività anti infiammatoria dell'AGP bovina potrebbe essere quello di accelerare la velocità di apoptosi delle cellule immunitarie.

Per quello che riguarda il sequenziamento del gene dell'AGP bovina, la traduzione del cDNA sequenziato ha rivelato una proteina di 219 AA la cui predizione delle modificazioni post-traduzionali ha rivelato 5 potenziali siti di N-glicosilazione e 7 potenziali siti di fosforilazione.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

La presente comunicazione riporta i risultati di un esperimento che aveva lo scopo di valutare l'attività di modulazione dell'apoptosi da parte di una proteina di fase acuta, la α 1-glicoproteina acida bovina, nei confronti di cellule effettrici della risposta immunitaria, i monociti CD14+.

E' stato evidenziato come la bAGP abbia una attività di tipo pro-apoptotico nei confronti di questa popolazione cellulare. La letteratura riguardante le funzioni immunomodulatorie dell'AGP riporta ampiamente varie attività che si focalizzano verso una complessiva funzioni anti-infiammatoria.

I risultati ottenuti in questo lavoro sono coerenti con quanto riportato dalla letteratura. Un aumento della velocità di apoptosi rappresenta, in effetti, un meccanismo per controllare direttamente l'attività di una cellula infiammatoria e quindi di ridurre gli effetti di una eccessiva risposta infiammatoria. Le prospettive future di questo lavoro sono, da una parte, allargare gli esperimenti ad altre popolazioni cellulari e, dall'altra, di purificare ulteriormente le varie glicoforme da cui è costituita la popolazioni di AGP per valutare quali di esse rivesta la maggiore importanza per quello che riguarda l'attività pro-apoptotica.

La sequenza della bAGP è stata depositata in banca dati (EMBL) con il seguente numero di accesso: AJ844606.

BIBLIOGRAFIA

Hocheplid T., Van Molle W., Berger F.G., Baumann H. and Libert C. Involvement of the acute phase protein alpha-1-acid glycoprotein in non specific resistance to a lethal gram-negative infection *J.Biol.Chem.*,275:14903-14909 (2000)
Fournier T., Medjoubi N-N. and Porquet D. Alpha-1 acid glycoprotein *Biochim.Biophys.Acta*,1482:157-171 (2000)
Tilg H., Vannier E., Vachino G., Dinarello C. and Mier J.J.W Antiinflammatory properties of hepatic acute phase proteins: preferential induction of interleukin-1 (IL-1) receptor antagonist over IL-1 beta synthesis by human peripheral blood mononuclear cells *J.Exp.Med.*,178:1629-2636 (1993)
Paulnock D. M. *Macrophages: a practical approach* Oxford University Press, Great Britain, (2000)

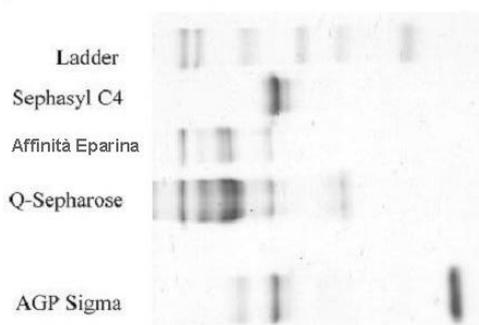


Figura 1: SDS-PAGE della purificazione della AGP bovina

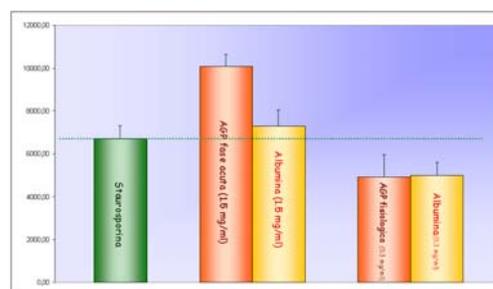


Figura 2: attività di modulazione dell'apoptosi da parte della bAGP

**LESIONI NEUROLOGICHE CENTRALI E PERIFERICHE NELLA MALATTIA DEL MOTONEURONE DEL
CAVALLO**

Salvadori Claudia, Arispici Mario, Cantile Carlo

Dipartimento di Patologia Animale – Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Pisa

Sono descritte le caratteristiche cliniche e patologiche di tre casi di malattia del motoneurone del cavallo (EMND). I soggetti, un cavallo da sella maschio castrato di 10 anni, un cavallo da sella femmina di 14 anni e un cavallo maschio castrato di razza Andalusia di 13 anni, hanno presentato una forma clinica a decorso cronico e progressivo con perdita di peso, moderata atrofia muscolare, affaticabilità, ampia base d'appoggio, profusa sudorazione, tremori muscolari generalizzati con esacerbazione dopo breve esercizio e tendenza al decubito. In tutti i soggetti sono state eseguite biopsie di nervo periferico e muscolo che hanno mostrato una marcata perdita di fibre mieliniche a distribuzione multifocale e fenomeni di degenerazione assonale accompagnati da marcata fibrosi endoneurale. Le biopsie di muscolo hanno rivelato la presenza di numerose fibre atrofiche angolari prevalentemente di tipo I, sparse fibre ipertrofiche e moderata fibrosi perimisiale. In un cavallo, soppresso per volontà del proprietario, sono state osservate lesioni a carico del SNC caratterizzate da cromatolisi centrale, coartazione dei neuroni con frammentazione del nucleo e inclusioni eosinofile citoplasmatiche simili a corpi di Bunina, oltre a perdita neuronale, gliosi e noduli gliali. Le lesioni erano localizzate a livello delle corna ventrali del midollo spinale e di alcuni nuclei dei nervi cranici e della formazione reticolare. L'EMND rappresenta una patologia raramente segnalata nel sud dell'Europa e deve essere differenziata dalle altre patologie neurologiche del cavallo descritte in Italia. La biopsia di nervo periferico e muscolo scheletrico rappresenta un attendibile strumento per la diagnosi di EMND in vita.

Parole chiave: cavallo, patologia del motoneurone inferiore, patologia neuromuscolare, biopsie di nervo e muscolo.

CENTRAL AND PERIPHERAL NERVOUS SYSTEM LESIONS IN EQUINE MOTOR NEURON DISEASE.

The clinical and pathological features of three cases of equine motor neuron disease (EMND) are described. A 10-year-old neutered male saddle horse, a 14-year-old female saddle horse and a 13-year-old neutered male Andalusian presented a chronic and progressive course of weight loss, moderate muscle atrophy, fatigue, wide based stance, frequent sweating, generalized muscle tremors and frequent tendency to recumbency. In all horses, peripheral nerve biopsies showed marked loss of myelinated fibers with a patchy distribution, scattered axonal degeneration with digestion chambers, myelin ovoids and marked endoneurial fibrosis. Muscle biopsies showed marked variation of the fiber size and shape with numerous angular atrophic fibers, mainly of type I, accompanied by scattered hypertrophic fibers and moderate perimysial fibrosis. In one euthanized horse, CNS lesions were characterized by central chromatolysis and shrunken neurons with fragmenting nucleus and eosinophilic intracytoplasmic inclusions (Bunina-like bodies). Neuronal loss, accompanied with reactive gliosis and scattered glial nodules were also observed. Lesions involved the ventral horns of the spinal cord and some nuclei of cranial nerves and reticular formation. Rare cases of EMND have been described in Southern Europe and the disease should be added to the list of equine neurological diseases described in Italy. Peripheral nerve and muscle biopsies represent a reliable *in vivo* diagnostic test for EMND.

Key words: horse, motor neuron disease, neuromuscular pathology, nerve and muscle biopsy.

LEUCOENCEFALOMALACIA NELL'EQUINO (ELEM): UNA MICOTOSSICOSI CAUSATA DA FUMONISINE

Iulini Barbara, Casalone Cristina, Corona Cristiano, Varello Katia*, Bellone Paolo**, Dondo Alessandro*, Caramelli Maria

CEA - Istituto Zooprofilattico Sperimentale (IZS) del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta

*Diagnostica - IZS Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta **

*ASL 7 di Torino ***

La leucoencefalomalacia dell' Equino (ELEM) è una sindrome neurologica acuta, mortale e non infettiva, nota col nome di "Moldy corn disease" (malattia del mais ammuffito).

Il primo caso di malattia è stato identificato negli Stati Uniti nel 1891 e successivamente sono stati segnalati altri casi in Cina, in Egitto, in Nuova Caledonia, in Brasile, in Francia ed in Sud Africa.

Tutti gli episodi di ELEM descritti nel mondo, sono stati associati al consumo di cereali ammuffiti e contaminati da Fumonisin B1 e B2 (FB1 e FB2), micotossine prodotte da *Fusarium verticillioides*.

In questo lavoro sono descritti due casi di ELEM verificatisi in due allevamenti differenti in Piemonte. I due animali, rispettivamente di 3 e 2 anni, mostravano sintomi neurologici caratterizzati da ipereccitabilità, incoordinazione dei movimenti e cecità. La diagnosi di ELEM è stata emessa sulla base delle lesioni macro e microscopiche del Sistema Nervoso Centrale associate ai segni clinici e all'isolamento di *Fusarium verticillioides* dall'alimento sospetto.

Il reperto macroscopico dell'encefalo era caratterizzato da una necrosi liquefattiva a livello della sostanza bianca e da emorragie diffuse. Il quadro neuropatologico rilevava invece la presenza di ampie ed irregolari zone in cui la sostanza bianca era disintegrata, emorragie perivascolari, edema ed infiltrato cellulare composto principalmente da plasmacellule ed eosinofili; a livello del fegato, invece si apprezzava una degenerazione torbida grassa diffusa.

L'analisi del mangime ha rilevato la presenza di FB1 e FB2 in concentrazione 1.5 volte più alta della dose considerata fatale per i cavalli dalla Food and Drug Administration. Questa è la prima segnalazione di ELEM effettuata in Italia, corredata dal riscontro nell'alimento delle Fumonisine.

Parole chiave: Equino, micotossicosi, encefalo.

EQUINE LEUKOENCEPHALOMALACIA (ELEM): A MYCOTOXICOSIS CAUSED BY FUMONISINS.

Equine leukoencephalomalacia (ELEM) is an acute, not infectious and highly fatal neurological disease of Equids, referred as "Moldy corn disease".

The disease was firstly reported in the United States in 1891 and it has been later described also in China, Egypt, New Caledonia, Brazil, France and South Africa. All known cases of ELEM through the world have been associated with the consumption of corn contaminated with Fumonisin B1 and B2 (FB1 and FB2), mycotoxins produced by *Fusarium verticillioides*.

Here we report two cases of ELEM occurred in two different stables in Piedmont. The horses, 3 and 2 yrs. old respectively, displayed hyperexcitability, lack of coordination and blindness.

The diagnosis of ELEM was based on tissue lesions in conjunction with clinical signs and the isolation of *F. verticillioides* from suspected feeds.

Gross pathological findings in CNS included multifocal liquefactive necrosis in the cerebral white matter and haemorrhagic foci in the brain stem. Histopathological examination revealed rarefaction of the white matter, perivascular haemorrhages, oedema and a cellular infiltrate composed mainly of plasma cells and eosinophiles in the brain and liver degeneration.

Analysis of feeds for toxins revealed the presence of FB1 and FB2 1.5 times higher than the dose considered fatal for horse by Food and Drug Administration.

This is the first report of ELEM in Italy supported by the detection of fumonisins in feed.

Key word: Equine, mycotoxicosis, brain.

**STUDIO ANATOMO-ISTOPATOLOGICO E IMMUNOISTOCHEMICO DI UN CASO DI CARCINOMATOSI
DIFFUSA IN UN CAVALLO**

Mazzariol Sandro¹, De Zan Gabrita¹, Stelletta Calogero², Cavicchioli Laura¹, Zappulli Valentina¹, Giuliani Alberto², Castagnaro Massimo¹

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

²Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie – Università di Padova

Un cavallo trotatore di 16 anni, maschio castrato, è stato sottoposto a indagine anatomopatologica dopo eutanasia, con sospetto diagnostico di polmonite *ab ingestis*, da esame citologico su lavaggio tracheo-bronchiale. Il soggetto si presentava con grave dispnea e progressivo scadimento delle condizioni corporee nei due mesi precedenti e, nonostante i tentativi terapeutici, non c'è stata remissione dei sintomi.

La necropsia ha permesso di evidenziare una massa irregolare, da biancastra a crema, di consistenza duro-compatta, che avvolgeva e infiltrava il rene sinistro e proseguiva cranialmente, in sede retroperitoneale, lungo il decorso dell'aorta, coinvolgendo la ghiandola surrenale sinistra e raggiungendo il mediastino attraverso lo iato aortico del diaframma. Alla superficie di taglio, presentava aspetto lobulato friabile con aree occasionali di emorragia e necrosi. Nelle cavità addominale e toracica si osservavano altre formazioni con caratteristiche simili, di dimensioni variabili, disseminate in vari organi e tessuti, prevalentemente nel mediastino craniale, nel parenchima epatico e polmonare. L'esame citologico per impressione dalle lesioni, ha messo in evidenza la presenza di *clusters* di cellule di origine epiteliale, lievemente atipiche, suggerendo l'ipotesi di una neoplasia di origine epiteliale. L'esame microscopico ha confermato la diagnosi di adenocarcinoma mucinoso, con un *pattern* prevalentemente cisto-papillare.

In base alle caratteristiche anatomico-istopatologiche le sedi primarie più probabili di tale neoplasia sono il rene e il polmone. L'indagine immunohistochemica ha evidenziato la positività delle lesioni polmonari e renali alle citocheratine, alla vimentina e alla S100. La coespressione di citocheratine e vimentina, che è presente nella maggior parte dei carcinomi renali derivanti da altre sedi, è invece piuttosto inusuale tra i carcinomi e può quindi suggerire il rene come sede primaria della carcinomatosi descritta. In particolare, poiché nel rene la S100 viene espressa dalle cellule epiteliali dei tubuli prossimali, del tratto discendente dell'ansa di Henle e dei tubuli collettori, l'origine della neoplasia descritta potrebbe essere individuata in tali strutture.

In letteratura l'incidenza dei carcinomi renali nel cavallo è bassa (0,055%) e le segnalazioni di carcinomatosi diffusa sono rare. In conclusione, il caso descritto in questo lavoro è l'unico in cui l'utilizzo dell'indagine immunohistochemica ha permesso di individuare come sede primaria di una carcinomatosi diffusa nel cavallo il rene.

Parole chiave: adenocarcinoma renale, carcinomatosi, cavallo, S100, vimentina.

**A CASE OF DIFFUSE CARCINOMATOSIS IN A HORSE: ANATOMO-HISTOPATHOLOGICAL AND
IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDIES.**

A 16-year-old trotter horse was evaluated for respiratory disease and found to have a diffuse carcinomatosis on postmortem examination. The histopathological examination confirmed a diagnosis of cysto-papillary adenocarcinoma. Although the primary tumor was not well defined on the basis of gross and microscopic findings, the coexpression of cytokeratin, vimentin and S100 immunohistochemistry suggest a renal origin.

Key words: renal adenocarcinoma, carcinomatosis, S100, vimentin.

SU UN CASO DI PEMFIGO FOLIACEO IN UN PULEDRO: RILIEVI CLINICO-PATOLOGICI

Sforna Monica; Brachelente Chiara; Lepri Elvio; Mechelli Luca

**Dipartimento di Scienze Biopatologiche ed Igiene delle Produzioni Animali e Alimentari, Università di Perugia.*

Le malattie autoimmunitarie nel cavallo sono piuttosto rare e, nell'ambito di queste, il pemfigo foliaceo (PF) è la dermatopatia di più frequente riscontro in medicina equina. Il caso si riferisce ad un puledro, maschio, di 2 mesi d'età, che mostrava una dermatite caratterizzata da lesioni multifocali, coalescenti, alopeciche, crostoso-scagliose, pruriginose, localizzate alla testa, collo, tronco, coda e porzioni distali degli arti. L'animale è stato sottoposto ad indagini cliniche, ematologiche, citologiche e biotiche. I prelievi citologici sono stati colorati con May-Grünwald-Giemsa, mentre i campioni biotici sono stati fissati in formalina neutra tamponata al 10%, processati secondo le tecniche di routine, tagliati a 4µm di spessore e colorati con E-E, PAS e Giemsa. L'esame citologico evidenziava una popolazione cellulare rappresentata da granulociti neutrofili non degenerati e cheratinociti acantolitici singoli o in gruppi. Istologicamente, si rilevava una dermatite pustolosa subcorneale caratterizzata dalla presenza di lesioni contenenti granulociti neutrofili e cheratinociti acantolitici, sovrastate da spesse croste sierocellulari costituite da neutrofili degenerati e cellule epidermiche esfoliate. Nel derma superficiale era presente un infiltrato perivasale di cellule mononucleate (monociti-macrofagi, linfociti e plasmacellule), granulociti neutrofili e rari eosinofili. Sulla base degli aspetti clinici, citologici e dermatopatologici è stata formulata la diagnosi di PF. Dopo terapia con desametasone l'animale ha presentato una completa remissione delle lesioni senza mostrare alcuna recidiva a distanza di 10 mesi. Il PF è una malattia autoimmune estremamente rara in medicina equina e l'osservazione in un così giovane animale, seguita da guarigione, appare come un evento di particolare interesse clinico-patologico.

Parole chiave: puledro, pemfigo foliaceo, cheratinociti acantolitici.

PEMPHIGUS FOLIACEUS IN A FOAL: CLINICAL AND PATHOLOGICAL FINDINGS.

Autoimmune skin diseases are relatively rare in the horse and, amongst them, pemphigus foliaceus (PF) is the most common. A two months old, male, foal was presented with multifocal to coalescing, alopecic, crusting and scaling lesions on the head, neck, trunk and distal legs. Pruritus was present. Clinical and haematological screenings were performed, together with cytological and histopathological examinations. Direct smears were stained with May-Grünwald-Giemsa and biopsy samples were processed for histological examination and stained with H&E, PAS and Giemsa. Citology showed a significant number of neutrophils with single or clusters of acantholytic keratinocytes. Histologically the lesions were characterized by subcorneal pustules containing neutrophils and acantholytic cells, covered by serocellular crusts with degenerated neutrophils and cellular debris. In the superficial dermis, a perivascular to interstitial infiltration with mononuclear cells, neutrophils and rare eosinophils was present. According to the clinical, cytological and dermathopathological findings, a diagnosis of PF was made. The animal was treated with dexamethasone and the lesions have been in remission for several months without therapy. The importance of this report can be seen in the low incidence of PF in equine medicine, especially in young horse, and to the successful course of the disease, both rarely described in the veterinary literature.

Key words: foal, pemphigus foliaceus, acantholytic keratinocytes.

MIOPATIE CONGENITE NEL PULEDRO

Paciello Orlando, *Pasolini Maria Pia, Martano Manuela, Trapani Francesca, Papparella Serenella.

Dipartimento di Patologia e Sanità Animale –Settore di Anatomia Patologica (PO, RC, PS)

**Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie – Sezione di Clinica Chirurgia (P MP)*

Università degli Studi di Napoli Federico II.

Le miopatie congenite sono dei disordini muscolari ereditari accomunati da uno specifico danno morfologico delle fibre muscolari. Esse si osservano generalmente nei soggetti molto giovani, sono non progressive e/o caratterizzate da una progressione lenta e si esprimono con debolezza ed ipotonia muscolare. In questo lavoro, gli Autori descrivono 4 casi di miopatie congenite in puledri con debolezza muscolare e contratture e precisamente: 1- la Central Core Disease (CCD), 2- la Disproporzione Congenita del Tipo Fibrile (CFTD), 3- la Miopatia da Accumulo di Lipidi (MAL) 4- la Distrofia Muscolare Congenita (CMD). Nella CCD, le tecniche istoenzimatiche (COX, SDH e NADH-TR) evidenziavano aree centrali - cores - prive di attività metabolica ossidativa. Con l'immunoistochimica, utilizzando un anticorpo anti-desmina, i cores erano chiaramente delineati. Ultrastrutturalmente i cores erano caratterizzati da sarcomeri preservati, con uno scarso numero di mitocondri, linee Z irregolari e reticolo sarcoplasmatico e tubuli T anormali. Nella CFTD il quadro morfologico era caratterizzato da piccoli gruppi di fibre atrofiche, atrofia delle fibre tipo I, mentre le fibre tipo II mostravano diametri generalmente superiori. Nella MAL si osservavano numerose goccioline lipidiche nelle fibre muscolari, soprattutto nelle fibre tipo I. Ultrastrutturalmente, le goccioline lipidiche erano prive di membrane ed erano disposte tra le miofibrille o in sede subsarcolemmatica. Nella CMD si osservava proliferazione di tessuto connettivo, variabilità dei diametri fibrili, necrosi e mancata differenziazione delle fibre. Gli Autori ribadiscono l'importanza dell'esame istopatologico ed ultrastrutturale per una corretta diagnosi delle miopatie che clinicamente possono mostrare quadri sovrapponibili.

Parole chiave: Miopatie Congenite, puledro.

CONGENITAL MYOPATHIES IN THE FOAL.

The congenital myopathies have been described in the child and in several species of domestic animals. They are characterised by a specific structural change of the muscle fiber, weakness and hypotonia evident in early life; they are hereditary and nonprogressive or slowly progressive. Up to now, few cases of congenital myopathies have been reported in the foal. We describe a Central Core Disease (CCD), a Congenital Fiber Type Disproportion (CFTD), a Lipid Storage Myopathy (LSM) and a Congenital Muscular Dystrophies (CMD) in four foals with severe muscle weakness and contractures. In the CCD, histoenzymatic stains (COX, SDH, NADH-TR) showed centrally located areas, devoid of oxidative enzyme activity. Immunohistochemical localization of desmin delineated clearly the cores and a desmin network were within the cores. Ultrastructurally, the cores showed preserved sarcomeres with a low number of mitochondria, irregular Z lines, with streaming or a zigzag appearance and abnormal sarcoplasmic reticulum profiles and T tubules. In the CFTD, we observed atrophy of type I fibers and type II fibers appeared larger than type I fibers. In the LSM, an abnormal amounts of lipid accumulated in muscle. The lipid accumulation were mostly in type I fibers. Ultrastructurally, the lipid droplets were not membrane-bound and accumulate in parallel rows between the myofibrils or subsarcolemmally. Finally, the CMD was characterised by increased connective tissue, variation in fiber diameter and necrosis. Furthermore, we observed the lack of fiber type differentiation.

Key words: Congenital Myopathies, foal.

USO DEI MINI-PIGS IN TOSSICOLOGIA PRE-CLINICA

Alberta Argentino Storino^{o^}, Andrea Grassetti[^], Elisabetta Rossiello[^], Loretta Valdoni[^]

*RTC – Research Toxicology Centre – Pathology^o and Toxicology[^] Departments - Via Tito Speri 12
Pomezia (Roma) – Italy*

Scopo di questa presentazione è fornire informazioni circa gli aspetti scientifici e procedurali, relativi all'uso dei Mini-pigs nella valutazione tossicologica di prodotti chimici e farmaceutici, in accordo con le richieste in ambito regolatorio.

I seguenti aspetti sono presi in considerazione:

l'uso dei Mini-pigs in sostituzione dei cani come specie non roditrice: il cane è comunemente usato, in virtù delle sue dimensioni, della sua fisiologia ben conosciuta, della facilità di reperimento e di manipolazione. Ma, in confronto alla specie umana, i cani hanno alcune peculiari caratteristiche fisiologiche, che possono influenzare la biodisponibilità dei farmaci. Inoltre, ragioni di tipo etico possono limitarne l'uso.

il fornitore, includendo costi, numero di animali disponibili, tempi di consegna etc.: il principale fornitore in Europa è Ellegaard Gottingen Mini-pigs, Dalmose, Denmark.

esperienza in RTC: tipologie di studio, laboratori, stabulazione, applicazione di procedure operative.

Inoltre, vengono presentati dati di ematologia, chimica clinica ed istopatologia, ottenuti da animali controllo.

Parole chiave: maiali, specie non-roditrici, sostituzione studi cane.

THE USE OF MINI-PIGS IN TOXICOLOGY.

The aim of this presentation is to provide information about the scientific and technical aspects regarding the use of Mini-pigs in safety testing of chemical and pharmaceutical products, in order to meet regulatory requirements.

The following points are examined:

the use of Mini-pigs, in substitution of dogs as non-rodent species: the dog is commonly used, by virtue of its size, well-characterised physiology, availability and ease of handling. But, in comparison with humans, dogs have some unique physiologic attributes that can affect the disposition of drugs. Besides, ethical reasons may limit their use.

supplier, including cost, number of available animals, time of delivery etc.: the major supplier in Europe is Ellegaard Gottingen Mini-pigs, Dalmose, Denmark.

experience at RTC: study types, facilities, husbandry, application of operational procedures

In addition, haematology, clinical chemistry and histopathology data from control animals are presented.

Key words: minipigs, non-rodent species, dog study substitution.

**L'USO DEL MODELLO ANIMALE PREDITTIVO IN UNA NUOVA STRATEGIA TERAPEUTICA PER
L'ARTRITE REUMATOIDE**

Elena Ammannati, Vittoria Ardisson, Carbonatto Michela

Pathology and Pharmacology Units - Istituto di Ricerche Biomediche A. Marxer - RBM, Via Ribes 1, Collettero Giacosa, Italia

L'Artrite Reumatoide (AR) è una tra le più gravi malattie articolari, caratterizzata dall'attivazione dei leucociti e loro infiltrazione nelle articolazioni, con conseguente distruzione dell'osso e della cartilagine articolare. I modelli animali di artrite indotta da collagene, che si avvalgono dell'uso del topo, mimano la patologia di AR studiata e conosciuta nell'uomo, di cui i neutrofili ed i mastociti sono componenti cellulari indispensabili. Recentemente è stato dimostrato che l'isoforma γ del PI3K gioca un ruolo essenziale nel mediare il meccanismo di chemotassi dei leucociti, la proliferazione dei fibroblasti e la degranolazione dei mastociti, spesso tramite l'attivazione della G-protein quando legata ai recettori. Un'inibitore specifico (Compound 1) del PI3K è stato testato per via orale in topi con artrite collagene-indotta. Il trattamento è iniziato alle prime manifestazioni cliniche della malattia, e protratto per 7 gg. consecutivi (4 gruppi trattati a dosi diverse). Il dosaggio più alto, comparato all'effetto dell'indometacina, usata in clinica umana nelle prime fasi della malattia, ha dimostrato in clinica di ridurre il gonfiore del piede. Compound 1 inoltre ha dimostrato di ridurre di circa il 30% l'infiammazione della sinovia e l'erosione della cartilagine articolare. Questi risultati confermati anche dall'HIC dimostrano il potenziale predittivo del modello animale usato.

Parole chiave: A.R. Artrite Reumatoide, topo.

**A PREDICTIVE MOUSE MODEL USED IN A NOVEL THERAPEUTIC STRATEGY FOR RHEUMATOID
ARTHRITIS.**

Rheumatoid arthritis (RA) is one of the most severe articular diseases hallmarked by massive leukocyte activation and infiltration into joints resulting in cartilage and bone destruction. Murine models of collagen-induced arthritis mimic the pathology of human rheumatoid arthritis, for which neutrophils and mast cells are indispensable cellular components. Recently, PI3K γ isoforms, have been demonstrated to play essential roles in mediating leukocyte chemotaxis, synovial fibroblast proliferation and mast cell degranulation, often upon activation of G-protein coupled receptors. A specific PI3K isoform inhibitor, Compound 1, was tested. in a well established model of murine collagen-induced arthritis. Treatment started at the first clinical signs of disease and continued for 7 consecutive days (four groups administered different oral doses). At the high dose, clinical score and paw swelling were significantly reduced. The ameliorating effect was comparable with that exerted by indomethacin, used in the early management of arthritis. Also, as regards histopathological lesions, Compound 1 reduced synovial inflammation and cartilage erosion by about 30%. In addition, administration of Compound 1 at the high dose decreased PI3K-dependent phosphorylation of PKB/Akt and increased the presence of apoptotic cells (reduced in arthritic lesions) in post-arthritic paws (determined by IHC method). Our findings suggest that this has predictive potential animal model and that targeting PI3K signaling may provide an innovative therapeutic strategy for autoimmune/inflammatory diseases such as RA.

Key words: Rheumatoid Arthritis, mouse.

**LAC Z STAINING: VALUTAZIONE FENOTIPICA DELL'ESPRESSIONE GENICA IN TOPI
GENETICAMENTE MODIFICATI**

Michele Ardizzone, Maria Chiara Magnone, Michela Carbonato

Pathology and Pharmacology Units, Istituto di Ricerche Biomediche A. Marxer - RBM, Via Ribes 1, Colletterto Giacosa, Italia

La sequenziazione di un sempre maggior numero di geni eucarioti e la comprensione della loro organizzazione strutturale, hanno rivolto l'attenzione ai complessi schemi di espressione genica, nel tentativo di dare una risposta a dove, come e quando questi siano attivati e quali interazioni possano avere con singole cellule, tessuti o con l'intero organismo (fenotipizzazione). La "Lac Z staining" è una colorazione istochimica che rivela la presenza della beta-galattosidasi, proteina enzimatica facilmente rintracciabile negli organi/tessuti animali, la cui sintesi in topi knock-out esprime l'attivazione del gene reporter introdotto, codificante la "beta-galattosidasi", in sostituzione del gene in ricerca, divenendo un indicatore del fenotipo del gene stesso. La "Lac Z staining" visualizza la presenza della beta-galattosidasi sia nell'organo "in toto" sia in specifici tessuti/cellule. Il metodo utilizzato nei nostri laboratori prevede uno screening iniziale sull'organo "in toto" e successivamente, in base alla positività, sulla sezione istologica. Gli animali knock-out sono sempre valutati in parallelo con animali wild-type per discriminare gli organi/tessuti falsamente positivi.

Parole chiave: LacZ staining; espressione genica; fenotipizzazione; beta-galattosidasi.

LAC Z STAINING: PHENOTYPING OF GENE EXPRESSION IN GENETICALLY MODIFIED MICE.

As more and more eukaryote genes are sequenced and their structural organization understood, attention becomes focused on complex schemes of gene expression in an attempt to give an answer as to how and when they are activated, and what interaction they may have with single cells, tissues or the whole organism (phenotyping). Lac Z is a histochemical stain that reveals the presence of beta-galactosidase, an enzymatic protein easily found in animal organs/tissues and which, when synthesized in knock-out mice, expresses activation of the reporter gene inserted, coding the beta-galactosidase by substituting the gene under study, becoming an indicator of the phenotype of the gene itself. Lac Z staining shows up the presence of beta-galactosidase both in the whole organ and in specific tissues/cells. The method used in our laboratories consists of preliminary screening on the whole organ and subsequently, if positive, on histological sections. Knock-out animals are always assessed in parallel with wild-type animals to discriminate false positive organs/tissues.

Key words: Lac Z staining; gene expression; phenotyping; beta-galactosidase.

ANALISI ISTOPATOLOGICA DEL MODELLO ANIMALE DI IPERSENSIBILIZZAZIONE DA CONTATTO (CHS)

Marozin Cristiano, Carbonatto Michela, Ferro Pamela, Ferrandi Chiara

Pathology Unit-RBM, Via Ribes 1, Collaretto Giocosa, Italia

La dermatite allergica da contatto (CHS) è una risposta immunitaria, mediata dai linfociti T, che si manifesta a livello di epidermide. Durante la fase di sensibilizzazione, i linfociti T vengono iniziati dalle cellule di Langerhans. Il contatto successivo con l'antigene, determina l'infiltrazione cutanea delle cellule T iniziate, il reclutamento di altre cellule responsabili del processo infiammatorio, e la presenza di edema. Sulla base di questo meccanismo immunologico, il modello CHS è utilizzato per testare nuove molecole potenzialmente attive su patologie quali psoriasi e dermatiti allergiche. In questo modello sperimentale, i topi sono stati sensibilizzati mediante l'applicazione di dinitrofluorobenzene a livello del padiglione auricolare. L'aumento di spessore del padiglione è stato misurato dopo 24 h. In seguito alla somministrazione sottocutanea e topica di dexametasone alla dose di 0.5 mg/kg, è stata osservata all'esame istopatologico una riduzione di edema, infiltrato infiammatorio e iperplasia epiteliale. L'analisi delle sezioni istologiche in morfometria evidenzia come la reazione infiammatoria sia maggiormente evidente a livello di derma e epidermide e che la somministrazione di dexametasone riduca questo tipo di reazione.

Parole chiave: dermatite allergica da contatto, topo, morfometria.

HISTOPATHOLOGICAL ANALYSIS OF THE MOUSE MODEL OF CONTACT HYPERSENSITIVITY (CHS).

Contact hypersensitivity (CHS) is a T cell-mediated immune response in the epidermis to a reactive hapten covalently coupled to cell surface proteins. During the sensitization phase, the hapten-specific T-cells mediating the CHS reaction are primed by Langerhans cells. Subsequent contact or challenge with the hapten results in cutaneous infiltration of the primed T cells, recruitment of other inflammatory cells and presence of edema. The CHS model is used to test new molecules with potential activities on disease such as psoriasis and allergic dermatitis. In this experimental model, mice were sensitized and challenged by applying dinitrofluorobenzene (DNFB) to either side of both ears. Increase in ear swelling (μm) was measured 24h after challenge with an engineer's micrometer. Following subcutaneous and topical administration of dexamethasone at 0.5 mg/kg (positive control), reduction of edema, cellular infiltration of inflammatory cells and epithelial hyperplasia was seen at histology. A detailed analysis (morphometry) of the ear sections showed that the inflammatory reactions induced by DNFB occurred mostly on derma and epidermis of the skin and the topical administration of dexamethasone was able to reduce the inflammatory response against the hapten.

Key words: Contact hypersensitivity, mouse, morphometry.

**PIXANTRONE (BBR 2778), UN NUOVO FARMACO ANTITUMORALE NON CARDIOTOSSICO
STRUTTURALMENTE CORRELATO A MITOXANTRONE, RIDUCE LA GRAVITÀ DELL'ENCEFALITE
ALLERGICA ACUTA E CRONICA INDOTTA SPERIMENTALMENTE NEL RATTO**

Crippa Luca

Cell Therapeutics Europe S.r.l. – Via Ariosto 23, 20092 - Bresso (MI)

Mitoxantrone (MX) è un farmaco antitumorale recentemente introdotto quale immunomodulatore nel trattamento della sclerosi multipla (SM) il cui impiego a lungo termine è però limitato dal suo provato potenziale cardiottossico. Pixantrone (PIX) è un farmaco antitumorale strutturalmente molto simile a MX ma potenzialmente meno cardiottossico. Di seguito sono riportati i risultati di attività e cardiottossicità ottenuti dopo trattamenti ripetuti di PIX vs MX in modelli di encefalite autoimmune sperimentale (EAE) acuta e cronica nel ratto. 30 ratti affetti da EAE cronica (indotta con inoculazione s.c. di omogenato di midollo spinale) sono stati divisi in 3 gruppi e trattati ripetutamente con soluzione salina, PIX 16,25 mg/kg/die o MX 1,2 mg/kg/die. 40 ratti con EAE acuta (indotta con inoculazione s.c. di myelin basic protein (MBP)) sono stati divisi in 2 gruppi e trattati con PIX 16,25 mg/kg/die o non trattati. Nel modello di EAE cronica, sia MX che PIX hanno indotto una marcata riduzione di WBC totali e di linfociti. Durante il periodo di osservazione di 72 giorni l'incidenza di ricadute è stata significativamente più bassa negli animali trattati con PIX. Nei gruppi trattati con PIX e MX i livelli di anticorpi anti-MBP erano significativamente più bassi che nei controlli. Studi in vitro hanno evidenziato in molti animali trattati con PIX una ridotta proliferazione di linfociti splenici. L'esame istopatologico del cuore ha confermato la marcata cardiottossicità di MX e la relativa innocuità di PIX. Nel modello di EAE acuta, le determinazioni ematologiche hanno evidenziato una riduzione nelle cellule CD3+, CD4+ e CD8+, ma soprattutto una marcata riduzione delle cellule CD45+. I titoli di anticorpo anti-MBP erano più bassi negli animali trattati con PIX e le manifestazioni cliniche di EAE erano significativamente meno gravi negli animali trattati con PIX (giorno 14). Studi in vitro hanno dimostrato che il trattamento con PIX riduceva marcatamente la reattività all'MBP dei linfociti splenici. Nonostante ulteriori studi preclinici siano necessari, i dati ottenuti sono a favore di un futuro utilizzo del PIX nel trattamento della sclerosi multipla.

Parole chiave: Pixantrone; sclerosi multipla; encefalite autoimmune sperimentale.

**PIXANTRONE (BBR 2778), A NEW NON-CARDIOTOXIC ANTINEOPLASTIC DRUG STRUCTURALLY
RELATED TO MITOXANTRONE, REDUCES THE SEVERITY OF RAT ACUTE AND CHRONIC
EXPERIMENTAL ALLERGIC ENCEPHALOMYELITIS**

Multiple sclerosis treatment with (MX) is often limited by its cardiotoxicity. The effect of the MX-related non-cardiotoxic drug Pix in EAE models was examined in this study. Rats with chronic EAE were treated with saline, PIX and MX; rats with acute EAE were not treated or treated with PIX. In chronic EAE, MX and PIX induced a reduction in total WBC, lymphocytes and Anti-MBP antibodies, and the incidence of relapses was significantly lower in the PIX group. In most of the PIX rats the in vitro studies evidenced a reduced proliferation of spleen lymphocytes. Histopathology confirmed MX cardiotoxicity while PIX did not induce any relevant cardiotoxic change. In acute EAE hematological determinations evidenced a reduction in CD3+, CD4+ and CD8+ cells, but the most impressive result was an extremely marked reduction in CD45+ cells. Accordingly, anti-MBP Ab titers were lower in the PIX group. The clinical signs of EAE were significantly less severe in PIX-treated. In vitro studies demonstrated that PIX treatment markedly reduced the reactivity of spleen lymphocytes to MBP. Although further pre-clinical studies are still needed, our data are a proof-of-concept in favor of a possible future role of PIX in the treatment of MS.

Key words: Pixantrone; multiple sclerosis; experimental autoimmune encephalitis.

EFFETTO DEL FARMACO ANTIMALARICO DIIDROARTEMISININA (DHA) SUGLI ERITROCITI DURANTE L'EMOPOIESI NEL SACCO VITELLINO DI EMBRIONI DI RATTO IN VITRO

Paola Della Torre¹, Monica Longo¹, Sara Zanoncelli¹, Piero Olliario^{2,3}

¹ *Dipartimento di Preclinical Development, Nerviano Medical Sciences S.r.l., Viale Pasteur 10, 20014 Nerviano, Milan, Italy*

² *UNICEF/UNDP/World Bank/WHO Special Programme on Research and Training in Tropical Diseases (TDR), Geneva, Switzerland*

³ *University of Oxford, Centre for Tropical Medicine and Vaccinology, Churchill Hospital, UK*

I derivati di Artemisinina sono farmaci antimalarici clinicamente efficaci ma controindicati nel primo trimestre di gravidanza in quanto studi preclinici hanno evidenziato embrioletalità. Per investigare il meccanismo della tossicità embrionale, abbiamo studiato diidroartemisinina (DHA) utilizzando colture di embrione di ratto post-impianto. Gli embrioni sono stati trattati aggiungendo al medium 0.01-2 µg/mL di DHA. L'ematoipoiesi a carico del sacco vitellino è risultata compromessa: a concentrazioni di DHA >0.05 µg/mL il sacco vitellino era ben vascolarizzato ma pallido; la formazione di vasi e la circolazione era normale anche se il sangue appariva più pallido del controllo. A concentrazioni >0.5 µg/mL anche l'apparato vascolare era alterato evidenziando sia una riduzione di diametro dei vasi sia una scomparsa di anastomosi. Tale quadro mostrava un notevole peggioramento a concentrazioni superiori. I preparati ematici da cytopspin mostravano una riduzione del numero di globuli rossi, i quali apparivano deformati o danneggiati. L'analisi ultrastrutturale ha evidenziato lesioni emopoietiche anche alla concentrazione di 0.05 µg/mL. I potenziali meccanismi in grado di indurre tossicità emopoietica sono discussi. In conclusione, i nostri risultati, oltre a spiegare le lesioni osservate in vivo consistenti in alterata emopoiesi e angiogenesi, confermano il periodo di sensibilità degli embrioni al trattamento con artemisinine come già riscontrato in altri studi in vivo. Inoltre il modello di coltura embrionale mostra che DHA agisce direttamente sull'embrione e annessi embrionali, cioè indipendentemente da fattori materni o placentali.

Parole chiave: Artemisinina, coltura embrionale, ratto.

EFFECT OF THE ANTIMALARIAL DRUG DIHYDROARTEMISININ (DHA) ON RED BLOOD CELLS DURING YOLK SAC HAEMATOPOIESIS OF RAT EMBRYOS IN VITRO.

Artemisinin derivatives are clinically effective and safe antimalarials but cannot be used during the first trimester of pregnancy because they cause embryo-lethal effects in pre-clinical in vivo studies. To investigate the mechanism of the developmental toxicity, we studied DHA in the rat whole embryo culture (WEC). DHA was added to the culture medium for the entire 48-hour culture period at 0.01-2 µg/mL. Yolk sac haematopoiesis was eminently susceptible: at DHA concentrations >0.05 µg/mL the visceral yolk sac was well vascularized but pale; yolk sac vessels formation and circulation appeared normal but blood was visibly paler than control. This effect increased with increasing DHA concentrations. At concentrations >0.5 µg/mL the vasculature also was affected. Vessel diameter was reduced, small anastomotic vessels were not visible, and the number of circulating cells was further reduced. At 1 µg/mL yolk sac vasculature and circulating cells were markedly reduced and at 2 µg/mL only a few poorly organized yolk sac vessels were present. Cytopspin blood preparations showed a reduction in the number of RBCs starting at concentrations >0.1 µg/mL, and deformed or damaged RBCs at concentrations >0.5 µg/mL. Ultrastructural analysis showed impairment of yolk sac hematopoiesis at 0.05 µg/mL. Mechanisms of DHA toxicity against embryonic red blood cells are discussed. In conclusion, our results provide an explanation for in vivo damage, namely defective haematopoiesis and angiogenesis, and confirm the period of sensitivity of embryos to artemisinin compounds found in other in vivo animal studies. Moreover, the WEC model shows that DHA affects the conceptus directly, i.e. independently of maternal or placental factors.

Key words: Artemisinin, whole embryo culture, rat.

ASPETTI EMERGENTI DALLO STUDIO ISTOPATOLOGICO DEL PANCREAS DI RATTI NEONATI DI DIVERSE CLASSI D'ETÀ, IN UN MODELLO SPERIMENTALE DI DEPLEZIONE DI CARNITINA: RISULTATI PRELIMINARI DI UNO STUDIO IN CORSO

Pesce Daniela¹, Agostini Patrizia¹, Alfano Anna Maria¹, Onali Assunta¹, Perna Elisa¹, Lucreziotti Maria Rita¹, Ricciolini Rita¹, Peschechera Alessandro¹, Carminati Paolo¹, Spagnoli Luigi Giusto²

¹*Sigma-Tau Industrie Farmaceutiche Riunite S.p.A., Pomezia ITALY;*

²*University of Rome "Tor Vergata" ITALY*

Il trattamento di ratte SD con Pivalato di Sodio (depletore di Carnitina) durante il periodo della gravidanza e dell'allattamento sembra determinare lo sviluppo di una condizione di insulino-resistenza nella prole, al raggiungimento dell'età adulta. In questa sede vengono riportati gli aspetti emergenti da uno studio morfo-funzionale attualmente in corso, intrapreso per valutare se la deplezione di Carnitina così indotta determini di fatto alterazioni dello sviluppo del pancreas in ratti poppanti di 3, 13 e 21 giorni di vita e se queste siano contrastate dal ripristino di normali livelli di Carnitina. Risultati preliminari dimostrano che la deplezione di Carnitina consegue un aumento sia delle dimensioni delle insule del Langerhans che dei livelli tissutali di insulina, in assenza di variazioni di rilievo nei valori di glicemia serica. Il trattamento con Carnitina si associa a valori delle dimensioni delle insule sovrapponibili a quelli registrati nei controlli di pari età (21 gg, dato disponibile al momento). In aggiunta, verranno presentati i principali aspetti distintivi del pancreas del ratto neonato di diverse classi d'età, emersi durante lo studio.

Parole chiave: deplezione di Carnitina, ratto neonato, pancreas in via di sviluppo, insulino-resistenza.

HISTOPATHOLOGICAL ASPECTS OF DEVELOPING PANCREAS IN NEWBORN RATS FROM A CARNITINE DEPLETION MODEL: PRELIMINARY RESULTS OF AN ONGOING STUDY.

Treatment of SD female rats with Sodium Pivalate (Carnitine-depletion inducer) during pregnancy and lactation seems to be related to the onset of insulin-resistance status in adult life of the offspring. The present (ongoing) study was aimed at evaluating whether Carnitine depletion induced during fetal-neonatal life can alter the remodelling of the endocrine pancreas, as well as its functionality, at different postnatal days (namely at 3, 13, 21 days after birth) and to assess possible effects after Carnitine restoration. Our preliminary data suggest that Carnitine depletion is associated with an increase in both Langerhans islets size and pancreatic insulin content, despite the absence of changes in peripheral glycemia values. Carnitine supplementation was associated with lower islets areas in Pivalate group, with values within the range observed in control animals (21st day recorded up to now). The main microscopic findings detected during the study on developing pancreas of newborn rats are going to be reported.

Key words: Carnitine depletion, newborn rat, developing pancreas, insulin-resistance.

LINEE GUIDA DI IMMUNOTOSSICOLOGIA: AGGIORNAMENTO E DISCUSSIONE

Jan Klapwijk

Department of Preclinical Development, Nerviano Medical Sciences S.r.l., Viale Pasteur 10, 20014 Nerviano, Milan, Italy

Nel dicembre 2004 la “International Conference for Harmonization” (ICH) ha rilasciato per consultazione la bozza della linea guida “Studi di immunotossicologia per farmaci ad uso umano (S8). Questa linea guida è stata preparata da un gruppo di esperti del settore che ha inizialmente analizzato lo *status quo* nelle tre regioni coinvolte nell’ICH (Unione Europea, Stati Uniti e Giappone) per poi evidenziare quali aspetti avrebbero potuto essere armonizzati. Una indicazione sulla prassi migliore da seguire è stata individuata sulla base di un questionario distribuito nel 2003. Inoltre, sono stati analizzati dati di 45 composti, in modo da valutare la adeguatezza dei sistemi attualmente disponibili e di creare una sorta di gerarchia di test da utilizzare nella valutazione del potenziale immunotossicologico di nuove entità chimiche. Alla fine è stato trovato un accordo su quali fattori debbano essere considerati una “fonte di preoccupazione” tale da dare l’avvio ad indagini aggiuntive.

Durante la stesura della bozza di queste linee guida, sono stati raccolti, ulteriori punti di vista incluso quello del Guideline Committee of the European Society of Toxicological Pathology (ESTP). In questa presentazione verrà fatta una panoramica sullo stato dell’arte dei test utilizzati in immunotossicologia, con un riassunto delle linee guida dell’ICH ed il probabile impatto che queste avranno sul lavoro del patologo tossicologo ed infine verranno evidenziate le aree nelle quali è necessario lo sviluppo di nuove metodiche di indagine. Seguirà una discussione sugli argomenti esposti nella presentazione, allo scopo di raggiungere un accordo sul migliore approccio da seguire nell’applicazione delle nuove linee guida nella routine del laboratorio di patologia tossicologica.

Parole chiave: linee guida regolatorie, ICH, immunotossicità.

IMMUNOTOXICOLOGY GUIDELINES: UPDATE AND DISCUSSION.

In December 2004 The International Conference on Harmonisation (ICH) released for consultation a draft guideline “Immunotoxicology Studies for Human Pharmaceuticals (S8)”. This guideline was prepared taking by an Expert Working Group which initially analysed the *status quo* in the 3 ICH regions (EU, US and Japan) and determined which aspects could be harmonised. Best practice was determined taking into account a questionnaire sent out in 2003. In addition, data for 45 compounds were analysed in order to assess the adequacy of currently available assays and to create a kind of hierarchy of tests which could be performed in investigating the immunotoxic potential of new chemical entities. Finally, consensus was reached on which factors should be considered a “cause of concern” to trigger further investigations.

In drafting this guideline additional opinion was received from various sources, including from the Guideline Committee of the European Society of Toxicological Pathology (ESTP).

This presentation will give an overview of the “state-of-the-art” in immunotoxicity testing, a summary of the ICH guideline and its likely impact on the work of toxicological pathologists and the areas where further method development is required. This will lead to a discussion about this subject with a view to agreeing on the best approach for implementation of the Guideline into day-to-day work.

Key words: regulatory guidelines, ICH, immunotoxicity.

POLMONITE ACIDOFILICA MACROFAGICA NEL TOPO

Giusti Anna Maria¹, Texido Gemma², Eugenio Scanziani³, Jan C. Klapwijk¹

¹ *Preclinical Development – Pathology* ² *In vivo Experimental Therapy, Nerviano Medical Sciences S.r.l. Viale Pasteur 10 - 20014 Nerviano (Mi) – Italy*

³ *DIPAV, Facoltà di Medicina Veterinaria – Università di Milano*

La polmonite macrofagica acidofila (AMP) è una patologia raramente descritta, presente apparentemente solo nel topo. E' caratterizzata dall'accumulo focale o diffuso di grossi macrofagi nel lume alveolare, che nelle sezioni colorate con Ematossilina ed Eosina presentano abbondante citoplasma eosinofilo costituito da materiale fibrillare o cristalliforme. Grossi cristalli eosinofili di forma allungata possono essere osservati anche liberi nel lume alveolare o bronchiale. Un'alta incidenza di AMP è stata riportata in topi anziani C57BL e 129Sv. Casi di AMP sono stati identificati istologicamente nei polmoni di topi transgenici K-ras-Lat2 presenti nei nostri stabulari. Lesioni sono state evidenziate in 5 animali su 58 esaminati, di età compresa tra 12 e 16 settimane, senza differenze di incidenza tra i due sessi. Tutti gli animali erano F1 (129sv x C57BL/6J). Nessuna lesione riferibile ad AMP è stata evidenziata nei polmoni dei 10 soggetti wildtype esaminati, appartenenti alle medesime nidiate. Sinora non è stata ancora chiarita la patogenesi per l'accumulo di questo materiale eosinofilo nei polmoni degli animali colpiti, benchè recenti studi supportino la tesi dell'importante ruolo delle proteine Ym, appartenenti alla famiglia delle chitinasi.

Parole chiave: polmonite acidofilica macrofagica, topi C57BL, topi 129Sv, proteine Ym.

ACIDOPHILIC MACROPHAGE PNEUMONIA IN MICE.

Acidophilic macrophage pneumonia (AMP) is a rarely reported disorder, apparently unique to mice. It is characterized by focal to widespread accumulation, within alveolar lumina, of large macrophages with intensely eosinophilic cytoplasm in H&E sections, composed by slightly fibrillar or crystalloid material. Large elongated eosinophilic crystals can also be observed in the alveolar and bronchial lumen.

A high rate of AMP has been reported in aged C57BL/6 and 129Sv mice.

AMP was observed in the lung of K-ras-Lat2 transgenic mice. All animals had a (129sv x C57BL/6J) F1 background. Incidence observed was 5/58 K-ras-Lat2 animals examined, ranging from 12 to 16 weeks of age, with no gender differences. No signs of AMP were noted in the lung of 10 age matched wild type littermates. So far, the nature of the eosinophilic material present in these lesions has not clearly been established, although growing evidence supports the key role of Ym proteins, members of the chitinase family, in the pathogenesis.

Key words: Acidophilic macrophage pneumonia, C57BL mice, 129Sv mice, Ym proteins.

**VALUTAZIONE RETROSPETTIVA DI PATOLOGIE POLMONARI COMUNI NEL RATTO SPRAGUE
DAWLEY USATO NEGLI STUDI PRECLINICI**

Anna Lanzoni¹, Ivo Faustinelli, Alessandro Piaia, Luca Cavaliere, Cristofori Patrizia

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

La valutazione microscopica del polmone viene richiesta negli studi preclinici di tossicità generale condotti nel ratto, sia preliminari (studi di precandidatura e dose-range) che definitivi. Tale valutazione è spesso rivolta all'individuazione di modificazioni minime di varia natura (infiammatoria, degenerativa, di accumulo, proliferativa) indotte dal trattamento. È quindi necessario che il patologo lettore possieda una ampia confidenza con i quadri di patologia che possono essere presenti nel tessuto polmonare e nell'albero bronchiale di animali sottoposti a trattamento con veicoli di varia natura (animali di controllo). Questo permetterà di poter interpretare in modo corretto le eventuali variazioni indotte dal trattamento con composti. In questo lavoro viene presentata un casistica di quadri di patologie polmonari osservate nel corso del 2004 su ratti Sprague Dawley di 12-14 settimane di età in studi preclinici di tossicologia generale, condotti per via orale nei nostri laboratori. In particolare, verranno presentati quadri infiammatori compatibili con infezioni respiratorie virali, patologie ascrivibili a inalazione di materiale estraneo o a problemi legati al trattamento per via orale.

Parole chiave: Sprague-Dawley, Ratto, Polmoni, Istologia, Patologia.

**RETROSPECTIVE EVALUATION OF BACKGROUND PULMONARY LESIONS IN SPRAGUE DAWLEY
RATS USED IN PRECLINICAL STUDIES.**

Microscopic evaluation of the lungs is required in general toxicology preclinical studies, both preliminary (precandidate selection or dose-range studies) and definitive studies. This evaluation is often addressed to the individuation of minimal modifications, attributable to inflammatory, degenerative, accumulative, proliferative conditions. It is therefore necessary that the reader pathologist has wide knowledge about background pathology in pulmonary tissue from animals treated with various vehicle (control animals). This will allow a correct interpretation of variations induced by the treatment with the test compound. In this work, some cases of background pulmonary changes observed in preclinical studies in 2004 in Sprague Dawley rats (12-14-week old) will be presented. In particular, inflammatory pictures, possibly compatible with viral infections and pathological changes attributable to inhalation of foreign material and/or problems related to oral gavage will be presented.

Key words: Sprague-Dawley, Rat, Lung, Histology, Pathology.

LESIONI SPONTANEE E INDOTTE DA COMPOSTI NEI TESTICOLI DI RATTI SPRAGUE DAWLEY IN STUDI PRECLINICI

Piaia Alessandro, Lanzoni Anna, L. Cavaliere, Cristofori Patrizia

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

L'indagine istopatologica dell'epitelio seminifero di ratto negli studi preliminari e in quelli definitivi, associata alla valutazione morfologica dell'epitelio seminifero nella sua progressione maturativa (*staging*), rappresenta la chiave più sensibile per evidenziare la tossicità testicolare di nuovi composti in sviluppo. È usuale il riscontro di lesioni spontanee quali: quadri di apoptosi/degenerazione che coinvolgano le cellule germinali, presenti negli stadi XVI e I, come anche di quadri di atrofia/ipoplasia tubulare sia di pochi tubuli come della loro totalità, esemplificati dal criptorchidismo. Tali lesioni si caratterizzano generalmente come quadri unilaterali, occasionali o correlabili al normale ricambio cellulare. Lesioni riferibile al trattamento, al contrario, evidenziano aspetti di specificità coinvolgendo spesso precisi stadi di sviluppo della linea cellulare. Nella nostra esperienza i quadri più spesso osservati in studi di breve durata sono stati i seguenti: in uno studio di 14 giorni quadri di degenerazione/necrosi dei pachiteni associata a cellule binucleate nei piani degli spermatociti degli stadi II-VIII, risultante in una progressiva atrofia tubulare; in un altro studio sono prevalsi quadri di degenerazione/esfoliazione degli spermatidi allungati negli stadi X-XIII, esitanti in una deplezione degli stessi nello stadio I; compresenti, quadri di cellule giganti polinucleate nei piani degli spermatidi rotondi degli stadi I-III o VI-IX. Infine, in uno studio di 4 settimane, si è vista una degenerazione degli spermatociti allungati negli stadi XII-XIV.

Parole chiave: Sprague-Dawley/epitelio seminifero/testicolo/tossicità/staging.

SPONTANEOUS AND DRUG-INDUCED CHANGES IN THE TESTES OF SPRAGUE DAWLEY RATS IN PRECLINICAL STUDIES.

Histopathologic evaluation of testes is routinely performed in preliminary and regulatory studies and it is considered to be the most sensitive endpoint for detecting testicular toxicity. Routine stage grouping are recommended to better evaluate the "stages" and more attention should be paid in some specific stages (VII or IX-XI, or XII). Spontaneous changes can be observed in animals and must be differentiated from the treatment-related ones. Apoptotic/degenerated changes involving germ cells might be observed in stages XIV and I. Atrophic/hypospermatogenic tubules can be observed multifocally in the testes, or sometime diffusely in cryptorchidism. Many of these changes are often unilateral, incidental or related to normal cell turn-over. Treatment-related effects are usually specific, characterized by cell degeneration and involving selective pattern of maturation. In our recent experience (2 preliminary and one regulatory studies) we observed: pachytene degeneration/necrosis in one 14-day study, leading to progressive pachytene depletion and eventually to tubular atrophy; occasionally associated with binucleated cells (pachytene spermatocytes of STAGES II-VIII) and spermatid retention (STAGES X-XI). Different lesions were observed in another 14-day study: elongated spermatid degeneration/exfoliation (mainly in the STAGES X-XIII and/or I) eventually leading to spermatid depletion (STAGE I), associated with binucleated to polinucleated giant cells, variably present in the spermatid layer of STAGES I-III and/or VI-IX. Finally in a 28-day study, elongated spermatid degeneration/exfoliation was seen, mainly affecting STAGES XII-XIV, with evidence of partial recovery.

Key words: Sprague-Dawley/seminiferous epithelium/ toxicity/ staging.

**VALUTAZIONE ISTOLOGICA DEL TESTICOLO NEL CANE BEAGLE USATO NEGLI STUDI PRECLINICI.
CRITERI PER DETERMINARE GLI STAGE DEL CICLO DELL'EPITELIO SEMINIFERO E CONFRONTO
CON IL RATTO SPRAGUE DAWLEY**

Defazio Rossella, Lanzoni Anna, Cristofori Patrizia

Safety Assessment Dept. Histopathology Unit Research Centre GlaxoSmithKline, Via Fleming, 4 Verona Italy

La valutazione istologica del testicolo viene routinariamente eseguita negli studi preclinici preliminari e sub-cronici (14 giorni 1 mese) nel ratto Sprague Dawley e nel cane Beagle. I molteplici e complessi meccanismi ormonali e metabolici che regolano lo sviluppo delle gellule germinali testicolari costituiscono numerosi potenziali target di tossicità, e la valutazione istologica è considerata il più sensibile e precoce indicatore di tossicità testicolare per un farmaco in sviluppo. Dal momento che nessuno studio di fertilità nel maschio viene condotto prima della somministrazione della nuova molecola all'uomo, in particolare ai volontari sani maschi della fase 1, l'esame istologico del testicolo nelle specie precliniche negli studi 14 giorni/1 mese riveste una primaria importanza. Per aumentare l'accuratezza della valutazione, nel nostro laboratorio l'esame istomorfologico viene integrato dalla valutazione del ciclo di maturazione dell'epitelio seminifero (staging) in entrambe le specie precliniche valutate. Nonostante la morfogenesi dell'acrosoma e la forma della testa degli spermatozoi allungati siano i criteri comuni per definire lo stage, alcune peculiarità della spermatogenesi del cane, come la minor rigidità nell'organizzazione e nella sincronizzazione, rendono inappropriato il metodo utilizzato nello staging del ratto. L'obiettivo della seguente presentazione è dettagliare l'argomento con fotografie di preparati istologici che possano illustrare queste analogie e differenze.

Parole chiave: Cane, Testicolo, Staging, Studi Preclinici.

**HISTOLOGICAL EVALUATION OF THE TESTIS IN THE BEAGLE DOG IN PRECLINICAL STUDIES.
CRITERIA TO DETERMINE THE STAGES OF THE SEMINIFEROUS EPITHELIUM CYCLE AND
COMPARISON WITH THE STAGING IN THE SPRAGUE DAWLEY RAT.**

Histological evaluation of the testis is routinely performed in preliminary and sub-chronic (14-day, 1-month) preclinical studies in the Sprague Dawley rat and in the Beagle dog. The complexity and variety of the metabolic and hormonal events, which rule the germinal cell development, provide numerous potential target of toxicity, and the histological evaluation is considered the most sensitive and early indicator of testicular toxicity for a new developing drug. Since no fertility male studies are conducted before the administration of a new compound in the healthy male volunteers of the FTIH, the microscopic evaluation of the testis in preclinical species in 14-day, 1-month studies has a paramount relevance, integrated with the evaluation of the staging of the seminiferous epithelium. Although the morphogenesis of the acrosoma and the head shape of the elongated spermatozoa are the common criteria to define a stage, some characteristics of the dog spermatogenesis, as the less rigidly organization and synchronization, make the rat staging scheme unsuitable. The aim of this presentation is to detail this issue with histological samples pictures to show these analogies and differences.

Key words: Testis, Dog, Staging, Preclinical studies.

L'APPARATO RIPRODUTTORE FEMMINILE NEL RATTO SPRAGUE DAWLEY USATO NEGLI STUDI PRECLINICI: ISTOLOGIA DEL CICLO ESTRALE ED ESEMPI DI QUADRI CORRELATI ALLA SOMMINISTRAZIONE DI COMPOSTI

Cavaliere Luca, Lanzoni Anna, Piaia Alessandro, Cristofori Patrizia.

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

La valutazione del pericolo e del rischio eseguita sugli organi dell'apparato riproduttore femminile negli studi preclinici rimane un importante strumento per una valutazione più completa di un nuovo farmaco. Gli effetti di un nuovo farmaco sui tessuti dell'apparato genitale femminile (ovaie, ovidotti, utero, cervice o vagina) possono essere relativamente semplici da riconoscere microscopicamente ma difficili da interpretare. Infatti la regolazione delle modificazioni morfologiche estrali che si osservano è legata ad una secrezione ormonale complessa (asse ipotalamo-ipofisario-ovarico), basata su un meccanismo di controllo a feed-back con fattori stimolatori positive o con inibitori negativi. Ogni interferenza su questo controllo può portare ad alterazioni strutturali e funzionali con conseguente disfunzione sessuale (cambiamenti della libido, infertilità). Nel ratto, specie più utilizzata in tossicologia, il ciclo estrale dura quattro giorni ed è composto da quattro stadi: proestro, estro, metaestro e diestro. Ogni stadio è contraddistinto da specifiche caratteristiche istologiche in vari tessuti; in ogni stadio ci deve inoltre essere corrispondenza tra le caratteristiche istologiche dei vari organi o tessuti. Lo scopo di questo lavoro è mostrare una panoramica delle modificazioni istologiche osservate nel ratto Sprague Dawley, che avvengono normalmente nelle varie fasi del ciclo estrale. Inoltre esso dettaglia alcune modificazioni istologiche indotte da nuovi farmaci, cercando di suggerire i possibili meccanismi coinvolti. Alcuni composti usati negli studi pre-clinici hanno mostrato di poter interferire con la funzione riproduttiva animale.

Parole chiave: apparato riproduttore femminile; ratto; ciclo estrale; istologia; valutazione rischio e pericolo.

FEMALE REPRODUCTIVE SYSTEM IN SPRAGUE DAWLEY RAT USED IN PRECLINICAL STUDIES: HISTOLOGY OF THE OESTRUS CYCLE AND EXAMPLES OF DRUG-RELATED CHANGES.

Hazard and risk assessment of the female reproductive organs in preclinical studies remains an important part of the preclinical assessment of novel drug. Drug-related effects on female genital system tissues (ovaries, oviducts, uterus, cervix and vagina) may be relatively simple to detect microscopically but difficult to interpret. The regulation of the morphology of the oestrus changes is based on complex hormonal secretion (hypothalamic-pituitary-gonadal axis) that involves a feedback control: positive factors (stimulatory) or negative (inhibitory). Any disruption of this control may result in structural and functional alterations that lead to a sexual dysfunction (changes in libido, infertility). Exogenous compounds can interfere at any of these control levels or more rarely directly to tissues. The oestrus cycles in the rat lasts four days and it is composed by four stages: proestrus, oestrus, metoestrus and dioestrus. Every stage is characterized by specific histological changes and in a single stage should be a correlation/link physiologic among the tissues. Some compounds in preclinical studies have been shown to interfere with reproductive function in animals. The aim of this work is to show the normal histological features observed in Sprague Dawley rat in different phases of the oestrous cycle. In addition it shows some histological changes due to new drugs and suggests the possibility mechanism involved.

Key words: female reproductive system; rat; oestrus cycle; histology; hazard and risk assessment.

STUDI NON-CLINICI IN ANIMALI GIOVANI: PERCHÉ, QUANDO E COME?

Rosaria Cicalese[^], Rosa Anna Manno^o, Loretta Valdoni[^]

Research Toxicology Centre – Pathology^o and of Toxicology[^] Departments – Via Tito Speri, 12 – 00040 Pomezia (Roma) Italy

E' ormai noto che fasi fondamentali dello sviluppo dell'uomo e degli animali proseguono anche dopo la nascita. La crescente attenzione sulla salute dei bambini ha aumentato la necessità di perfezionare il *safety assessment* (la valutazione di sicurezza) rispetto alla popolazione infantile. Gli enti regolatori FDA Pediatric Rule e le recenti normative EPA hanno rapidamente stabilito e via via incrementato la richiesta di studi non-clinici in animali giovani. Tuttavia, ci sono diversi criteri per stabilire quando gli studi in animali giovani sono necessari e scientificamente validi per garantire il *safety assessment*. Ricercatori di livello internazionale provenienti da università, enti governativi ed industrie lavorano insieme per identificare protocolli sperimentali da applicare negli animali giovani. Tutti concordano sul fatto che la costruzione di tale tipologia di studi deve essere decisa ed applicata caso per caso. Fra gli aspetti da prendere in esame vi sono i tipi di pazienti, l'organo target nell'adulto, il meccanismo di azione e la classe farmacologica.

Parole chiave: tossicologia giovani animali, farmaci pediatrici.

JUVENILE ANIMAL STUDIES: WHY, WHEN AND HOW?

It has long been recognised that important stages of development continue postnatally in both humans and animals. Recent attention to children's health has increased the need to improve safety assessments in pediatric populations. Compliance with the FDA Pediatric Rule and current EPA regulations have rapidly created an increasing demand for juvenile animal studies. However, there are many challenges in order to determine when juvenile animal studies are necessary to provide safety assessments and a necessary scientific basis to determine if studies may be performed. An international group of scientists from academia, industry and government with a common interest in juvenile animal studies, work together to identify testing strategies and agreed that case-by-case determinations should be made as to when juvenile animal studies are needed. Key considerations for each case should include for example: the patient population, the relevant adult organ toxicity, the mechanism(s) of action, and class effects.

Key words: juvenile toxicology, juvenile animals, pediatric drugs.

INFEZIONE DA MORSO DI TOPO DI LABORATORIO RIFERIBILE A *GEMELLA MORBILLORUM*

Belluco Sara¹, Cocilovo Alessandra¹, Schioppa Tiziana², Invernizzi Anna³, Riva Federica¹, Scanziani Eugenio¹

¹ Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria Università degli Studi di Milano

² Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, Milano

³ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna-Sezione diagnostica Provinciale di Milano

L'esposizione ad agenti zoonosici è un rischio lavorativo per il personale che tratta animali da laboratorio, benché questi siano a bassa carica infettiva. Il morso è un evento non infrequente e possibile responsabile della trasmissione di agenti zoonosici.

Riportiamo un caso riconducibile ad infezione da *Gemella morbillorum* in una ricercatrice a seguito di morso da topo, ceppo C57, in buono stato di salute.

Entro poche ore dall'esposizione, la paziente ha sviluppato linfangite brachiale, linfoadenopatia ascellare e ipertermia, guariti in 8 giorni con terapia antibiotica e antinfiammatoria. L'animale è stato sacrificato e sottoposto ad esame necroscopico, istologico, immunofluorescenza diretta per rabbia ed esame batteriologico del cavo orale.

All'esame batteriologico è stato isolato un batterio Gram positivo tipizzato biochimicamente come *G. morbillorum*.

G. morbillorum, formalmente *Streptococcus morbillorum*, è un commensale dell'oro-faringe, tratto gastro-enterico e genito-urinario dell'uomo. E' stato isolato da casi di meningite, ascessi cerebrali, artrite ed endocardite valvolare, conseguenti a uno stato di rottura della barriera mucosale. Nel nostro caso si può ipotizzare una infezione da *G. morbillorum* trasmessa tramite morso di topo. La presenza spontanea di *G. morbillorum* non è mai stata descritta nel cavo orale di topo, ma infezioni sperimentali hanno dimostrato tale possibilità. Inoltre l'uomo è sensibile a *Streptococcus moniliformis*, trasmesso da morso di topo e ratto, e responsabile di una sintomatologia simile a quella da noi descritta. Il risultato della tipizzazione biochimica del ceppo non esclude comunque la possibilità di una specie diversa da *G. morbillorum*.

Parole chiave: topo, zoonosi, *Gemella morbillorum*.

MOUSE BITE INFECTION PUTATIVELY ASSOCIATED TO *GEMELLA MORBILLORUM*.

Exposure to zoonotic agents is an occupational hazard for biomedical facility personnel. Animal bite represents an important way of transmission of zoonotic agents.

We present a case of infection putatively caused by *Gemella morbillorum* due to a laboratory mouse bite.

A scientist was bitten by a C57 mouse and within few hours she developed local lymphadenopathy and hyperthermia. The animal was euthanized. Necropsy, histology, immunofluorescence test on brain tissue and bacteriological exam from a mouth swab were performed. Gram-positive cocci were isolated and identified as *G. morbillorum*.

G. morbillorum, formally *Streptococcus morbillorum*, is part of the commensal flora of the human mucosae. It is also an infrequent cause of human infection generally associated with the breakdown of the mucosal defense. The symptoms we described can be related to a mouse bite infection by *G. morbillorum*. Its presence in the mouse oral cavity has never been described previously, though sperimental implantation into mice canal root was associated with lymphonodal transmigration. Another type of *Streptococcus*, *Streptococcus moniliformis*, is transmitted to humans by rat and mouse bite and it is the causative agent of a syndrome quite similar to that occurred in our case.

Key words: Mouse, zoonosis, *Gemella morbillorum*.

INTRODUZIONE

La "Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care" e "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" stabiliscono come fondamentale l'identificazione e la valutazione dei rischi connessi all'utilizzo di animali a fini sperimentali (Hankenson *et al.*, 2003). Questi rischi vengono identificati nel morso, nel contatto con agenti chimici, allergici o zoonosici.

Il morso è un evento non infrequente nella pratica di laboratorio e la sua importanza è correlata non solo alla elevata incidenza in stabulario (bin Zakaria *et al.*, 1996), ma anche all'entità del trauma e alla possibile fonte di trasmissione di agenti zoonosici: i morsi di cane e di gatto sono responsabili della trasmissione di patogeni rispettivamente fino al 28%

e all'80% dei casi (Weese *et al.*, 2002). Inoltre la maggior parte di questi agenti risulta non correlato a sintomi clinici negli animali da laboratorio, mentre nell'uomo provoca forme cliniche di gravità variabile, da simil-influenzali fino a morte (Hankenson *et al.*, 2003).

In questo lavoro presentiamo un caso di infezione in una ricercatrice, a seguito di morso di topo di laboratorio. La donna, di 30 anni di età e in buone condizioni di salute, durante le normali pratiche di laboratorio è stata morsiata da un topo. A tre ore dall'incidente ha sviluppato prurito ed edema del dito, che si è esteso al braccio con successivo aumento di volume dei linfonodi ascellari e ipertermia. Si è recata al pronto soccorso dove hanno prescritto una terapia di 8 giorni con desloratadina, nimesulide, amoxicillina e acido clavulanico. Già dopo tre giorni dall'inizio della terapia i sintomi erano regrediti.

MATERIALI E METODI

Il topo morsiatore era eterozigote per proteina p50, con background C57BL/6, di 6 settimane di età, in buone condizioni di salute. A seguito dell'incidente è stato sacrificato e sono stati effettuati: un tampone del cavo orale per esame batteriologico e caratterizzazione biochimica con Api 20 Strep, il prelievo del cervello per esame per rabbia, un esame necroscopico completo durante il quale sono stati prelevati per esame istologico polmoni, cuore, tratto gastroenterico, fegato, milza, reni, pancreas, genitali. Gli organi sono stati processati secondo routine, inclusi in paraffina e sono state ottenute sezioni di 4 micron colorate con ematossilina-eosina.

RISULTATI

L'animale è risultato negativo all'esame per rabbia. Nessun reperto di rilievo è stato riscontrato all'esame necroscopico e all'esame istologico.

All'esame batteriologico è stato isolato in colonia pura uno streptococco alfa emolitico caratterizzato biochimicamente come *Gemella morbillorum* con una affidabilità del 65.4%.

DISCUSSIONE

G. morbillorum, formalmente *Streptococcus morbillorum*, è stata riassegnata al genere *Gemella* nel 1988 a seguito di riscontri molecolari (omologia di DNA) (Zakir *et al.*, 2004). È uno streptococco, alfa emolitico, Gram positivo, anaerobio facoltativo che cresce in corte catene. È stata isolata nell'uomo dalle mucose dell'oro-faringe, tratto gastroenterico e genito-urinario, ma raramente è associata a infezioni, quali, soprattutto, endocarditi valvolari (Kazuya Akiyama *et al.*, 2001; Zakir *et al.*, 2004). La terapia antibiotica di elezione è il trattamento con penicillina, anche se negli ultimi casi descritti si sono verificate resistenze (Zakir *et al.*, 2004). La terapia chirurgica viene consigliata in corso di insufficienza cardiaca progressiva, larghe vegetazioni endocardiche ad elevato rischio di trombi settici ed allergia agli antibiotici (Kazuya Akiyama *et al.*, 2001).

G. morbillorum, che generalmente è un commensale, assume un ruolo di patogeno con la rottura della barriera mucosale, a seguito soprattutto di pratiche dentistiche, ma anche per esami diagnostici enterici. In due casi riportati in letteratura, il passaggio in circolo del batterio si è verificato a seguito dell'utilizzo di iniezioni endovena in soggetti tossicodipendenti (Zakir *et al.*, 2004). A seguito della rottura della barriera mucosale, in soggetti predisposti per immunodepressione, diabete mellito, disfunzioni epato-renali e patologie cardiache, si ha la localizzazione e lo sviluppo di lesioni che consistono per la maggior parte in endocarditi valvolari a sede aortica, mitrale o tricuspide, e occasionalmente in ascessi cerebrali o shock settici (Vasishta *et al.*, 1996; Kazuya Akiyama *et al.*, 2001; Spagnoli *et al.*, 2003; Zakir *et al.*, 2004).

Nel nostro caso possiamo supporre che *G. morbillorum* fosse un commensale del cavo orale del topo. Il morso ha verosimilmente inoculato il batterio a livello parenterale con successivo passaggio ai linfonodi satelliti. La possibile colonizzazione del cavo orale del topo di *G. morbillorum* è stata dimostrata sperimentalmente (Ribeiro-Sobrinho *et al.*, 2001; Ribeiro-Sobrinho *et al.*, 2005).

La bassa affidabilità del risultato della caratterizzazione biochimica può essere dovuta a due motivi. Innanzitutto, nel sistema Api 20 Strep non sono presenti alcune prove biochimiche che permettono l'esatta caratterizzazione del tipo di *Gemella*, quali maltosio sucrosio e lattosio, come evidente in tabella 1. I risultati ottenuti pongono comunque in evidenza che non si possa trattare di *Gemella cunicola* o *Gemella palaticanis* (Collins *et al.*, 1999; Hoyles *et al.*, 2000) per la discordanza nelle prove di fermentazione rispettivamente di mannitolo e trealosio. Inoltre non è da escludere che si possa trattare di una specie di *Gemella* non ancora caratterizzata e specifica del topo, come è già successo per cane e coniglio.

In conclusione, nel presente lavoro viene riportato il primo isolamento di *Gemella* spp dal cavo orale di topo. Tale isolamento viene correlato, anche sulla base delle osservazioni condotte in persone infette da *G. morbillorum*, allo sviluppo di una grave infezione locale in una ricercatrice morsa dal topo infetto. Inoltre emerge come sia importante, in corso di morso da animale di laboratorio, effettuare un esame batteriologico del cavo orale, con successivo

antibiogramma, per evidenziare l'eventuale presenza di un patogeno, che potrebbe essere un agente di zoonosi non comune, e stabilire così un intervento profilattico/terapeutico adeguato.

BIBLIOGRAFIA

- Akiyama K, Taniyasu N, Hirota J, Iba Y, Maisawa K. Recurrent aortic valve endocarditis caused by *Gemella morbillorum*--report of a case and review of the literature. *Jpn Circ J.* 2001 Nov;65(11):997-1000.
- Bin Zakaria M, Lerche NW, Chomel BB, Kass PH : *Accidental injuries associated with non human primate exposure at two regional primate research centers (USA): 1988-1993.* *Lab Anim Sci.* 1996; 46: 298-304.
- Collins MD, Rodriguez Jovita M, Foster G, Sjoden B, Falsen E. *Characterization of a Gemella-like organism from the oral cavity of a dog: description of Gemella palaticanis sp. nov.* *Int J Syst Bacteriol.* 1999 Oct;49 Pt 4:1523-6.
- Hankenson FC, Johnston NA, Weigler BJ, Di Giacomo RF. *Zoonoses of occupational health importance in contemporary laboratory animal research.* *Comp Med.* 2003 Dec;53(6):579-601.
- Hoyles L, Foster G, Falsen E, Collins MD. *Characterization of a Gemella-like organism isolated from an abscess of a rabbit: description of Gemella cunicula sp. nov.* *Int J Syst Evol Microbiol.* 2000 Nov;50 Pt 6:2037-41.
- Ribeiro Sobrinho AP, Lanna MA, Farias LM, Carvalho MA, Nicoli JR, de Uzeda M, Vieira LQ. *Implantation of bacteria from human pulpal necrosis and translocation from root canals in gnotobiotic mice.* *J Endod.* 2001 Oct;27(10):605-9.
- Ribeiro-Sobrinho AP, Rabelo FL, Figueiredo CB, Alvarez-Leite JI, Nicoli JR, Uzeda M, Vieira LQ. *Bacteria recovered from dental pulp induce apoptosis of lymph node cells.* *Med Microbiol.* 2005 Apr;54(Pt 4):413-6.
- Spagnoli D, Innocenti L, Ranzi ML, Tomei G, Villani RM. *Cerebral abscess due to Gemella morbillorum.* *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2003 Aug;22(8):515-7. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2003 Jul 23.
- Weese JS, Peregrine A.S, Armstrong J: *Occupational health and safety in small animal veterinary practice: Part I-Non parasitic zoonotic diseases.* *Can Vet J* 2002. 43: 631-636.
- Zakir RM, Al-Dehneh A, Dabu L, Kapila R, Saric M. *Mitral bioprosthetic valve endocarditis caused by an unusual microorganism, Gemella morbillorum, in an intravenous drug user.* *J Clin Microbiol.* 2004 Oct;42(10):4893-6.

Prove biochimiche	<i>Gemella</i> ????	<i>G. morbillorum</i>	<i>G. haemolysans</i>	<i>G. palaticanis</i>	<i>G. cunicula</i>
Lattosio		-	-	+	-
Mannitolo	-	V	-	-	+
Maltosio		+	+	+	-
Sucrosio		+	V	+	-
Sorbitolo	-	+/-	-	-	
Trealosio	-	-	-	+	
ALP	-	-	+	-	+
APPA	-	V	-	+	-
GTA		V	V	+	-

TUMORI EMATOPOIETICI NEL TOPO. APPLICAZIONE DEGLI SCHEMI CLASSIFICATIVI DEL MOUSE MODELS OF HUMAN CANCERS CONSORTIUM

Marchesi Francesco, Scanziani Eugenio

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

Negli ultimi cinquant'anni la classificazione dei tumori ematopoietici murini ha conosciuto un'evoluzione concettuale e metodologica culminata nelle proposte del Mouse Models of Human Cancers Consortium (MMHCC) volte a fornire basi scientifiche per il confronto tra i tumori ematopoietici del topo e i corrispondenti linfomi e leucemie umane. Scopo del presente studio è quello di verificare l'applicabilità delle direttive del MMHCC alla classificazione di tumori ematopoietici di topo sperimentalmente indotti e spontanei.

Sono stati valutati 20 topi con tumori ematopoietici indotti mediante 2 differenti strategie sperimentali e 2 topi con linfoma spontaneo. I tessuti sono stati esaminati istologicamente e con immunohistochimica per CD3 e mieloperossidasi. Per 10 casi di tumori sperimentalmente indotti è stata eseguita una valutazione citologica di strisci di sangue periferico.

Nei gruppi di tumori sperimentalmente indotti sono stati identificati 3 linfomi T-linfoblastici, 7 leucemie mieloidi senza maturazione e 10 leucemie mieloidi con maturazione. I linfomi dimostravano espressione di CD3. L'espressione di mieloperossidasi appariva moderata nelle leucemie mieloidi senza maturazione e più consistente nelle leucemie mieloidi con maturazione. In dieci casi di leucemia mieloidi la valutazione citologica del sangue periferico ha identificato forme mieloidi immature circolanti. I due tumori spontanei sono stati classificati come linfomi diffusi a larghe cellule di tipo centroblastico e istiocito-associato.

L'applicazione degli schemi classificativi del MMHCC necessita di un consistente supporto tecnico ed esperienza interpretativa, purtuttavia costituisce un valido contributo scientifico per la caratterizzazione di modelli murini di linfoma e leucemia.

Parole chiave: Topo, tumori ematopoietici, istopatologia, immunohistochimica.

HEMATOPOIETIC TUMORS IN THE MOUSE. APPLICATION OF THE MOUSE MODELS OF HUMAN CANCERS CONSORTIUM CLASSIFICATION SCHEMES.

In the last fifty years the classification of murine hematopoietic tumors underwent a conceptual and methodological evolution resulting in the proposals from the Mouse Models of Human Cancers Consortium (MMHCC) designed to provide scientific basis for the comparison between murine hematopoietic tumors and the corresponding human lymphomas and leukemias. The aim of this study is to evaluate the feasibility of the MMHCC proposals to classify both experimentally induced and spontaneous murine hematopoietic tumors.

Twenty mice bearing experimentally induced hematopoietic tumors and 2 mice bearing spontaneous lymphomas were evaluated by histopathology and immunohistochemistry for CD3 and myeloperoxidase. For 10 cases of experimentally induced tumors a cytologic evaluation of peripheral blood smears was performed.

In the groups of experimentally induced tumors we identified 3 T-cell lymphoblastic lymphomas, 7 myeloid leukemias without maturation and 10 myeloid leukemias with maturation. The lymphomas expressed CD3. The expression of myeloperoxidase was mild in myeloid leukemias without maturation and more prominent in myeloid leukemias with maturation. In the cases of myeloid leukemia immature myeloid forms were detected in the peripheral blood. The spontaneous cases were classified as diffuse large cell lymphomas of centroblastic and histiocyte-associated types.

The application of the MMHCC proposals need a relevant technical support and a specific pathology expertise, but is a scientifically valuable tool for the characterization of mouse models of lymphoma and leukemia.

Key words: Mouse, hematopoietic tumors, histopathology, immunohistochemistry.

INTRODUZIONE

I progressi tecnologici nelle applicazioni della biologia e della genetica molecolari hanno consistentemente contribuito ad un'importante evoluzione delle strategie volte alla creazione e caratterizzazione di modelli murini di linfomi e leucemie umane. Il patologo veterinario fornisce un contributo determinante alla creazione e caratterizzazione di modelli murini di linfoma e leucemia mediante l'applicazione di schemi classificativi consistenti e riproducibili che

forniscano basi scientifiche per il confronto tra i tumori ematopoietici murini e le corrispondenti neoplasie umane. Negli ultimi cinquant'anni la classificazione dei tumori ematopoietici del topo ha conosciuto una consistente evoluzione concettuale e metodologica (1-5), culminata nelle recenti proposte classificative sviluppate dal Mouse Models of Human Cancers Consortium (MMHCC) (6-7). Lo scopo del presente studio è quello di valutare l'applicabilità degli schemi classificativi del MMHCC per la caratterizzazione di tumori ematopoietici murini sperimentalmente indotti o di origine spontanea.

MATERIALI E METODI

Sono stati valutati 20 topi con tumori ematopoietici indotti mediante due differenti strategie sperimentali e 2 topi con linfomi di origine spontanea. I tessuti sono stati fissati in formalina tamponata al 10% e processati per l'inclusione in paraffina. Sezioni di 4 µm sono state colorate con Ematossilina-Eosina per la valutazione morfologica. Per alcuni casi sezioni seriate dei tessuti coinvolti dall'infiltrazione neoplastica sono state colorate con metodica immunostochimica con anticorpi policlonali di coniglio diretti contro CD3 e mieloperossidasi. Per 10 casi di tumori ematopoietici sperimentalmente indotti è stata anche eseguita una valutazione citologica di strisci di sangue periferico prelevati prima dell'eutanasia dei soggetti. Gli strisci di sangue sono stati colorati con May-Grünwald Giemsa ed esaminati al microscopio ottico per l'identificazione di cellule neoplastiche circolanti. Sulla base dei reperti istopatologici, immunostochimici e citologici disponibili i tumori ematopoietici sono stati classificati secondo gli schemi proposti dal MMHCC (6-7).

RISULTATI

Nel gruppo di topi con tumori sperimentalmente indotti sono state identificati 3 casi di linfoma timico T-linfoblastico, 7 casi di leucemia mieloide senza maturazione e 10 casi di leucemia mieloide con maturazione.

I linfomi timici erano caratterizzati da una popolazione neoplastica relativamente monomorfa di elementi linfoidei di medie dimensioni con scarso citoplasma e nuclei per lo più tondeggianti od ovali con cromatina fine e nucleoli spesso prominenti. Frequente appariva il riscontro di macrofagi con accumulo citoplasmatico di residui di cellule apoptotiche che conferivano il caratteristico aspetto "starry sky" (fig. 1). In tutti i casi di linfoma timico era presente un cospicuo coinvolgimento polmonare con estensivi infiltrati neoplastici caratterizzati da una tipica distribuzione perivascolare e peribronchiale. Più variabili apparivano le evidenze di disseminazione metastatica a livello splenico, epatico, linfonodale, renale e del midollo osseo. In tutti i casi di linfoma timico le cellule neoplastiche evidenziavano una consistente espressione di CD3 (fig. 2). Il complesso dei reperti morfologici ed immunostochimici appariva consistente con una diagnosi di linfoma timico T-linfoblastico.

Tutti i casi di leucemia mieloide erano costantemente caratterizzati da un'estensiva o diffusa infiltrazione neoplastica a carico della milza e del midollo osseo. Molto frequente appariva la disseminazione a livello epatico (fig. 3), polmonare, e più variabili le evidenze di coinvolgimento renale e linfonodale. In 5 casi di leucemia mieloide senza maturazione e cellule neoplastiche dimostravano una positività citoplasmatica per mieloperossidasi variabile da scarsa a moderata (fig. 4). In 6 casi di leucemia mieloide con maturazione l'espressione di mieloperossidasi nelle cellule neoplastiche appariva più prominente. In 4 casi di leucemia mieloide con maturazione, pur in assenza di dati immunostochimici sull'espressione di mieloperossidasi, consistenti evidenze di maturazione granulocitaria erano evidenti anche solo su base morfologica (fig. 5 e 6).

La valutazione citologica del sangue periferico in 10 casi di leucemia mieloide ha consentito di identificare la presenza di forme immature circolanti. Le forme mieloidi neoplastiche circolanti erano rappresentate da elementi di medie e grandi dimensioni con citoplasma blu, in alcuni casi caratterizzato dalla presenza di granulazioni azzurrofile. In 3 casi di leucemia mieloide senza maturazione e in 4 casi di leucemia mieloide con maturazione la percentuale di forme mieloidi immature nel sangue periferico era superiore al 20%. In 3 casi di leucemia mieloide con prominente maturazione granulocitaria evidente a livello istologico, la percentuale di forme mieloidi immature nel sangue periferico risultava inferiore al 20% e il quadro ematologico era caratterizzato da una prominente presenza di neutrofili alla quale si associava anche il riscontro di alcune forme mieloidi a stadi intermedi di maturazione.

Nei due topi con tumori linfoidei di origine spontanea la classificazione dei tumori è stata eseguita sulla base dei soli reperti istologici, non essendo disponibili dati immunostochimici. I due tumori sono stati classificati come linfomi diffusi a larghe cellule di tipo centroblastico e "istiocito-associato". Il linfoma centroblastico era caratterizzato da un diffuso coinvolgimento della milza e dei linfonodi e da reperti di estensiva disseminazione a livello epatico, polmonare, intestinale e renale. Il linfoma istiocito-associato evidenziava un diffuso coinvolgimento dei linfonodi e disseminazione a livello splenico ed epatico, ed era contraddistinto da aspetti morfologici molto caratteristici e distintivi. La popolazione neoplastica era costituita da elementi linfoidei di medie e grandi dimensioni ai quali erano associate sparse prominenti cellule giganti multinucleate e aree caratterizzate da una prevalenza elementi istiocitari con abbondante citoplasma eosinofilo.

DISCUSSIONE

Il presente studio ha fornito preliminari indicazioni sull'applicabilità degli schemi classificativi proposti dal MMHCC alla caratterizzazione di tumori ematopoietici murini sperimentalmente indotti e di origine spontanea. Nella casistica esaminata dati immunohistochimici erano disponibili solo per una parte dei tumori sperimentalmente indotti. L'anticorpo policlonale diretto contro CD3 ha dimostrato una buona efficacia nell'identificazione dei linfomi timici. Nei casi di linfoma timico osservato i caratteri morfologici delle cellule, i reperti di starry sky e l'espressione di CD3 sono stati considerati elementi sufficienti a supportare la diagnosi di linfoma T-linfoblastico. Nei casi di tumori ematopoietici non linfoidi l'anticorpo policlonale diretto contro mieloperossidasi ha rappresentato uno strumento utile per la caratterizzazione delle leucemie mieloidi, in particolare di quelle forme che apparivano caratterizzate da meno prominenti evidenze morfologiche di maturazione granulocitaria. E' però opportuno sottolineare che, ferma restando l'importanza delle analisi istopatologiche ed immunohistochimiche, un'appropriata caratterizzazione delle leucemie mieloidi deve essere supportata dalla valutazione citologica del sangue periferico. I due linfomi di origine spontanea sono stati classificati sulla base dei soli morfologici che sono stati considerati distintivi, purtroppo la mancanza di dati immunohistochimici non ha consentito di specificare l'origine dei due tumori dai linfociti B. Una rigorosa integrazione dei reperti macroscopici e istologici può fornire elementi utili alla classificazione dei tumori pur in assenza di dati immunohistochimici o molecolari. Nei casi in cui fossero disponibili solo reperti macroscopici e istologici e questi non dovessero apparire sufficienti, sarebbe opportuno omettere una sottoclassificazione precisa del tumore ematopoietico e porre possibili diagnosi differenziali sulla base dei dati disponibili.

CONCLUSIONE

Gli schemi classificativi proposti dal MMHCC costituiscono un valido strumento scientifico per la caratterizzazione dei tumori ematopoietici murini sperimentalmente indotti o di origine spontanea, ma la loro applicazione nella pratica quotidiana di un laboratorio di patologia implica la necessità di un consistente supporto tecnico e di esperienza interpretativa nell'ambito dell'ematopatologia.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Dunn T Normal and pathologic anatomy of the reticular tissue in laboratory mice with a classification and discussion of neoplasms. *J Natl Cancer Inst* 14: 1281-1433, 1954
- 2) Pattengale PK and Taylor CR Experimental models of lymphoproliferative disease: the mouse as a model for human non-Hodgkin lymphomas and related leukemias. *Am J Pathol* 113: 237-265, 1983
- 3) Perkins AS The pathology of murine myelogenous leukemias. *Curr Topics Microbiol Immunol* 149: 3-21, 1989
- 4) Fredrickson TN, Hartley JW, Morse HC IIIrd, Chattopadhyay SK, Lennert K Classification of mouse lymphomas. *Curr Topics Microbiol Immunol* 194: 109-116, 1994
- 5) Morse HC IIIrd, Qi C-F, Taddesse-Heath L, Chattopadhyay SK, Ward JM, Coleman A, Hartley JW, Fredrickson TN Novel aspects of murine B cell lymphomas. *Curr Topics Microbiol Immunol* 246: 249-254, 1999
- 6) Kogan SC, Ward JM, Anver MR, Berman JJ, Brayton C, Cardiff RD, Carter JS, de Coronado S, Downing JR, Fredrickson TN, Haines DC, Harris AW, Harris NL, Hiai H, Jaffe ES, MacLennan ICM, Pandolfi PP, Pattengale PK, Perkins AS, Simpson RM, Tuttle MS, Wong JF, Morse HC IIIrd Bethesda proposals for classification of nonlymphoid hematopoietic neoplasms in mice. *Blood* 100: 238-245, 2002
- 7) Morse HC IIIrd, Anver MR, Fredrickson TN, Haines DC, Harris AW, Harris NL, Jaffe ES, Kogan SC, MacLennan ICM, Pattengale PK, Ward JM Bethesda proposals for classification of lymphoid neoplasms in mice. *Blood* 100: 246-258, 2002

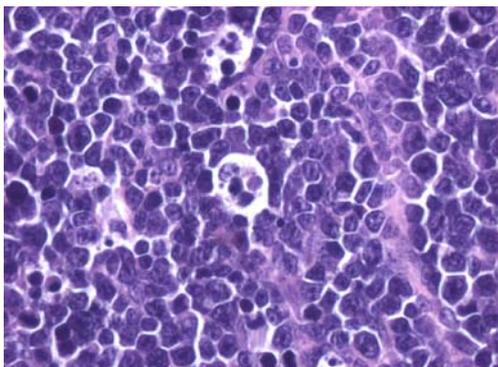


Figura 1
Linfoma timico T-linfoblastico. Timo: diffusa infiltrazione di elementi linfoidi neoplastici di medie dimensioni con scarso citoplasma, nuclei rotondi od ovali con cromatina fine e nucleoli prominenti. Sono presenti sparsi macrofagi con citoplasma stipato di detriti cellulari apoptotici che impartiscono il caratteristico aspetto "starry sky". Ematossilina Eosina, $\times 400$.

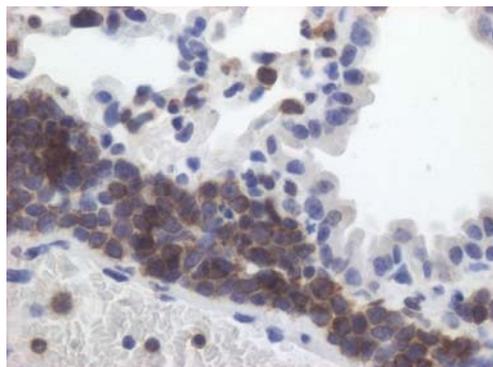


Figura 2
Linfoma timico T-linfoblastico. Polmone: un infiltrato perivascolare-peribronchiale di elementi linfoidi neoplastici caratterizzati da consistente espressione di CD3. Immunoistochimica ABC per CD3, controcolorazione con Ematossilina di Mayer, $\times 400$.

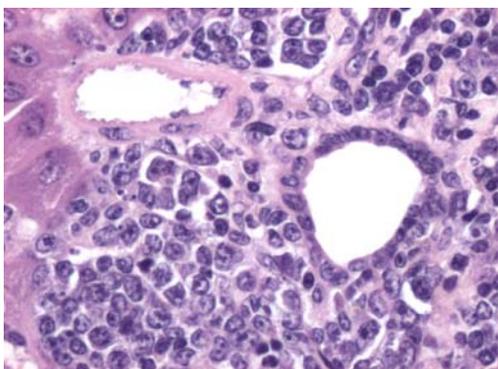


Figura 3
Leucemia mieloide senza maturazione. Fegato: estensiva infiltrazione periportale di elementi mieloidi immaturi senza evidenze morfologiche di maturazione granulocitaria, caratterizzati da scarso citoplasma debolmente eosinofilo, nuclei rotondi od ovali o leggermente ripiegati e irregolari con cromatina fine e nucleoli multipli. Ematossilina Eosina, $\times 400$.

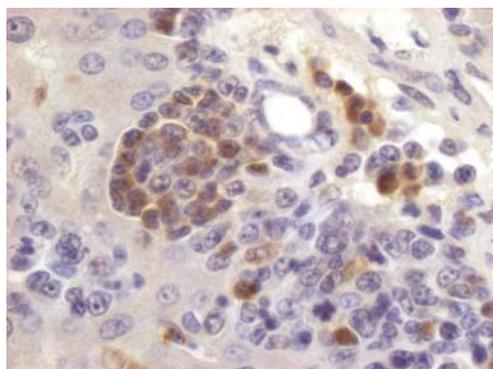


Figura 4
Leucemia mieloide senza maturazione. Fegato: gli elementi mieloidi neoplastici nell'infiltrato periportale evidenziano una moderata espressione di mieloperossidasi. Immunoistochimica ABC per mieloperossidasi, controcolorazione con Ematossilina di Mayer, $\times 400$.

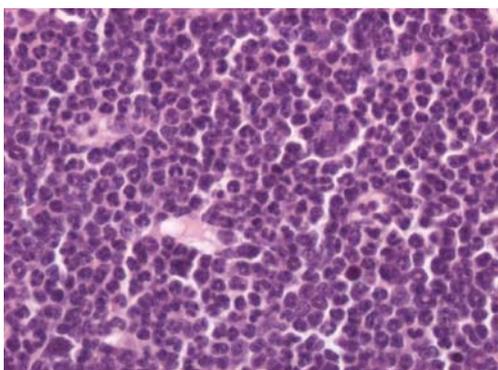


Figura 5
Leucemia mieloide con maturazione. Midollo osseo: diffusa infiltrazione di elementi mieloidi con prominenti evidenze morfologiche di maturazione granulocitaria. Ematossilina Eosina, $\times 400$.

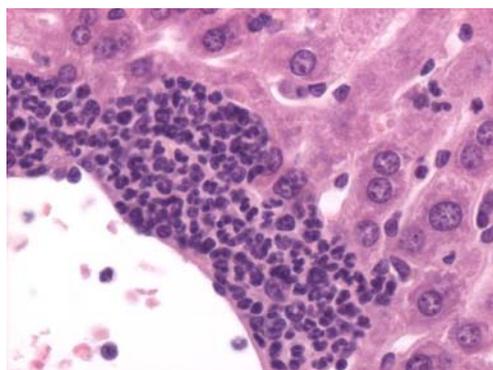


Figura 6
Leucemia mieloide con maturazione. Fegato: un infiltrato perivascolare di elementi mieloidi neoplastici caratterizzati da prominenti evidenze morfologiche di maturazione granulocitaria. Ematossilina Eosina, $\times 400$.

LA MICROSCOPIA ELETTRONICA A SCANSIONE ASSOCIATA A MICROANALISI A RAGGI X UNA TECNICA SEMPRE PIU' UTILIZZATA NELL'INDAGINE DIAGNOSTICA. ASPETTI E POTENZIALITA' IN PATOLOGIA TOSSICOLOGICA

Faustinelli Ivo¹, Bortolotti Federica², Rossetti Marco³, Cristofori Patrizia¹, Lanzoni Anna¹, Tagliaro Franco²

¹*Safety Assessment Dept. Histopathology Unit Research Centre GlaxoSmithKline, Via Fleming,4 Verona Italy,* ²*Dept. of Medicine and Public Health – Unit of Forensic Medicine, University of Verona, Verona Italy,* ³*Pharmaceutical Development Research Centre GlaxoSmithKline, Via A. Fleming Verona Italy.*

Il microscopio elettronico a scansione (SEM) e' simile al microscopio elettronico a trasmissione (TEM), entrambi infatti utilizzano una sorgente di elettroni diretta sul campione. Nonostante cio', le procedure di creazione e di ingrandimento dell'immagine sono completamente diverse; inoltre, mentre il TEM fornisce informazioni circa la struttura interna di campioni (es cellule, organelli intracitoplasmatici, membrane etc.) da sezioni ultrafini, il SEM e' primariamente utilizzato per l'analisi di superficie o di strutture superficiali. Tutti i sistemi SEM hanno normalmente dei sensori in grado di captare elettroni emessi secondariamente dal campione (elettroni secondari) con creazione conseguente di raggi X, utilizzati dal sistema per individuare la composizione chimica di una parte di campione (microanalisi a raggi X) piuttosto che per la creazione dell'immagine. La microscopia elettronica a scansione associata alla microanalisi a raggi X e' sempre piu' largamente utilizzata nell'ambito diagnostico, ad esempio per la valutazione di contaminanti presenti nell'aria e identificabili nel parenchima polmonare, in ambito medico legale, ad esempio per diagnosi di morte per annegamento, fino ad avere anche un utilizzo storiografico, quando usata nell'analisi di reperti rinvenuti in antiche tombe. Tale tecnica puo' essere utilizzata con successo anche in patologia tossicologica per evidenziare modificazioni di cellule e/o tessuti a livello superficiale ed identificare la presenza di eventuali tracce di sostanza somministrata. In questa presentazione verranno illustrati alcuni esempi di utilizzo delle tecniche e le potenzialita' del suo utilizzo nell'ambito della patologia tossicologica.

Parole chiave: SEM, raggi X, patologia tossicologica.

SCANNING ELECTRON MICROSCOPY ASSOCIATED WITH X-RAY MICROANALYSIS A TECHNIQUE INCREASING IN USE DURING A DIAGNOSTIC INVESTIGATION. ASPECTS AND POTENTIALITY IN TOXICOLOGICAL PATHOLOGY.

The scanning electron microscope (SEM) is similar to the transmission electron microscope (TEM) in that they both employ a beam of electrons direct to the specimen. However, the ways in which the images are produced and magnified are different and whereas the TEM provides information about the internal structure of thin specimens, the SEM is primarily used to study the surface or near surface structure of bulk specimens. All scanning electron microscopes normally have tools for detecting secondary electrons and backscattered electrons. Of the other radiations, X-rays are used primarily for chemical analysis (X-rays microanalysis) rather than images. Scanning electron microscopy associated with X-rays are increasingly used in diagnostic field, e.g. to evaluate presence of air contaminations in the lung parenchyma, in forensic medicine to diagnose death by drowning, and in historical research, e.g. to examine samples from ancient tombs. This technique can be successfully used in toxicological pathology as well to observe superficial changes in cells and/or tissues and identify the presence of compound traces. In this presentation, some examples about the use of these techniques will be illustrated, with particular attention to the potentiality in the toxicological pathology.

Key words: SEM, X-rays, toxicological pathology.

**MORFOMETRIA NUCLEARE ISTOGENESI TUMORALE E COMPORTAMENTO METASTATICO DEI
CARCINOMI MAMMARI CANINI**

De Vico Gionata (1), Cataldi Merielda (2), Danze' Lisa (1), Brunella Restucci (3),
Paola Maiolino (3).

(1) *Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria – Universtità' Di Messina.*

(2) *Veterinario libero professionista.*

(3) *Dipartimento di Patologia e Sanità' Animale – Università' Federico II di Napoli*

In questo lavoro, gli autori hanno valutato, mediante morfometria nucleare, il grado di corrispondenza dei valori relativi all'area e alla forma dei nuclei neoplastici, in rapporto all'istogenesi ed al comportamento metastatico verso i linfonodi regionali in 40 carcinomi mammari di cagna, classificati secondo i criteri di Benjamin et al (1999) in: Adenocarcinomi (24 casi di cui 16 "semplici" e 8 "complessi"), Carcinomi Duttulari (10 casi), Carcinoma in tumore misto (4 Casi), carcinomi anaplastici (2 casi). Di questi, 6 adenocarcinomi, 10 carcinomi duttulari, 2 carcinomi anaplastici e 2 carcinomi in tumore misto, avevano dato metastasi ai linfonodi regionali (N+), mentre gli altri erano no.(N-). I valori relativi all'area nucleare media, sono risultati significativamente più alti nei tumori N+ rispetto a quelli N- mentre non significative sono risultate le differenze registrate per il fattore di forma nucleare nei due gruppi di tumori. I dati in nostro possesso confermano (l'utilità) la necessità di avere una classificazione istogenetica dei tumori della mammella della cagna, dimostrando in accordo a quanto riportato da Benjamin et (1999) che i carcinomi duttulari sono un sottogruppo a più elevato potenziale di malignità; essi inoltre dimostrano che la morfometria nucleare, nell'ambito di una classificazione istogenetica, può consentire di individuare quei sottogruppi con un più alto potere metastatico.

Parole chiave: Morfometria nucleare, istogenesi, tumori mammari del cane.

**NUCLEAR MORPHOMETRY IN RELATION TO TUMOUR HISTOGENESIS AND METASTATIC
BEHAVIOUR IN CANINE MAMMARY CARCINOMAS.**

The assessment of nuclear area and nuclear form by morphometric analysis, has been investigated in 40 canine mammary carcinomas in relation to tumour histogenesis and metastatic behaviour to regional lymph-nodes. Twenty of these tumours showed lymph-node metastases (node-positive), and the other twenty were node-negative. The tumours were reviewed by two experienced pathologists blinded regarding their lymph-node status, and were classified according with the criteria suggested by Benjamin et al (1999). Node-positive tumours included six (6) adenocarcinomas, ten (10) ductular carcinomas, two (2) anaplastic carcinomas and two (2) carcinomas in mixed tumours; node-negative tumours included eighteen (18) adenocarcinomas – ten (10) simple adenocarcinomas, eight (8) complex adenocarcinomas – and two (2) carcinomas in mixed tumours. Node-positive tumours showed MNA and mean SDA values statistically different ($p < 0.001$) from node-negative carcinomas. No statistical differences were observed between the respective FF and SDF in the two tumour groups. Data of this study, seems to confirm the importance of an histogenetic classification in canine mammary tumours, also suggesting that morphometry may increase our diagnostic performances allowing a reproducible method for detecting single tumours with higher metastatic potential, at least within adenocarcinomas and carcinomas in mixed tumours.

Key words: Nuclear morphometry, histogenesis, canine mammary tumours.

**APPLICAZIONE DELL'IMMUNOISTOCHEMICA ALLA CITOLOGIA DIAGNOSTICA MEDIANTE LA
TECNICA DEL CELL-BLOCK**

Martano Manuela, Russo Valeria, Restucci Brunella, Maiolino Paola

*Dipartimento di Patologia e Sanità Animale – Settore di Anatomia Patologica, Facoltà di Medicina Veterinaria -
Facoltà di Scienze Biotechologiche - Università degli Studi di Napoli- Federico II

E' noto il ruolo di fondamentale importanza svolto dall'immunoistochimica nella diagnostica istopatologica. Nella citologia diagnostica, l'applicazione di tale tecnica è molto limitata. Questa limitata utilizzazione è dovuta principalmente al fatto che: - nonostante gli sforzi effettuati, non si è riusciti a standardizzare tale metodica per la citologia; - il materiale citologico è il più delle volte disperso sul vetrino. In Umana, qualora non si possieda una citocentrifuga, il metodo più semplice per ovviare a tali problematiche è quello di utilizzare la tecnica dei cell-blocks. Tale tecnica consiste nell'includere il materiale citologico in paraffina, ottenendo così dei campioni del tutto simili a quelli istologici. Scopo di questo studio è stato quello di dimostrare l'effettivo contributo che tale metodo apporta alla diagnostica neoplastica citologica.

Sono stati utilizzati n. 15 agoaspirati provenienti da varie neoplasie e da liquidi, quali urine e versamenti. Questi sono stati in parte strisciati e colorati come di routine per l'esame citologico e, in parte, sono stati fissati in lysis buffer. I pellets ottenuti dopo la processazione con il metodo modificato del cell-block, sono stati inclusi in paraffina, tagliati e sottoposti ad esame immunoistochimico. Nei cell-blocks la concentrazione delle cellule sul vetrino, l'architettura degli aggregati cellulari, così come i dettagli nucleari e citoplasmatici sono risultati maggiormente evidenziabili rispetto ai preparati citologici normali. Le indagini immunoistochimiche hanno permesso di definire l'istogenesi degli elementi cellulari, in quei preparati dove la semplice osservazione morfologica non aveva dato risultati certi. Perciò tale tecnica è di rilevante ausilio diagnostico, poichè risulta utile per l'applicazione dell'immunoistochimica alla diagnostica citologica dei tumori.

Parole chiave: immunoistochimica ; cell-block; oncologia.

**APPLICATION OF IMMUNOHISTOCHEMISTRY TO DIAGNOSTIC CYTOLOGY BY CELL-BLOCK
TECHNIQUE.**

Immunohistochemical analysis is a useful diagnostic tool in histopathological examination. In diagnostic cytology, immunohistochemical techniques have not been applied so far as the cells are scattered on glass slides. In Human medicine many studies have demonstrated that cell-block method allow to standardize the quality of cytological samples so that the immunohistochemical procedures can be applied. Furthermore, it does not need of any special equipping such as cytocentrifuge. The aim of this study was to evaluate the usefulness of cell-block method in cytopathology. For this study we used 15 cytological samples collected from tumours, by FNAB, and from body fluids. Cytological specimens were either routinely examined or processed using the cell-block method. The specimens were transferred to a labelled tissue cassettes and were included in paraffin. 5 µm sections were cut from the cell blocks, stained with haematoxylin and eosin, and collected to immunohistochemical studies. The results showed that the architectural features of neoplastic proliferation were seen more easily in cell blocks. Moreover, the cell-block permitted multiple sections and immunohistochemical analysis for histogenetic subtyping of neoplastic cells. We believe that cell block examination, coupled with immunohistochemical analysis, is a useful method for definitive diagnosis of tumours.

Key words: immunohistochemistry ; cell-block ; oncology.

INTRODUZIONE

E' noto il ruolo di fondamentale importanza svolto dall'immunoistochimica nella diagnostica istopatologica, in particolare in quella oncologica.

L'applicazione di tale metodica è, tuttavia, molto limitata nella diagnostica citologica. Questa limitata utilizzazione è dovuta principalmente al fatto che :

- Il materiale citologico utilizzabile per le indagini immunocitochimiche è il più delle volte scarso e notevolmente disperso sul vetrino;

Associazione Italiana di Patologia Veterinaria

- Nonostante gli sforzi effettuati, non si è riusciti a standardizzare tale metodica per la citologia, così come è stato fatto per l'istologia ;
- Le metodiche impiegate finora in medicina veterinaria (cytospin e cell-block) (Caniatti e coll., 1993) prevedono l'utilizzo di una citocentrifuga e risultano difficilmente applicabili alla diagnostica di routine, a causa dei costi piuttosto elevati.

In Umana, qualora non si possieda una citocentrifuga, il metodo più semplice per ovviare a tali problematiche è stato quello di utilizzare la tecnica del cell-block (Nithyananda e coll., 2000; Mayall e coll., 2003; Nga e coll., 2004; Brifford e coll., 2000).

Tale tecnica consiste nell'includere il materiale citologico in paraffina, dopo averlo centrifugato con una normale centrifuga, ottenendo così dei campioni del tutto simili a quelli istologici.

Scopo di questo studio è stato quello di dimostrare l'effettivo contributo che tale metodo apporta alla diagnostica neoplastica citologica.

MATERIALI E METODI

Sono stati utilizzati n. 15 campioni citologici, comprendenti sia agoaspirati provenienti da varie neoplasie, sia liquidi, quali urine e versamenti (Tabella 1). Parte del materiale citologico è stato strisciato, fissato all'aria e colorato come di routine (colorazione Diff-Quick) e il rimanente è stato fissato in lysis buffer. Dopo circa 12 ore, il campione in buffer è stato centrifugato per 10 minuti a 1500 rpm e, il sedimento, centrifugato nuovamente con alcool a 95°, è stato risospeso in alcool assoluto e ricentrifugato. Il pellet ottenuto, lasciato ad incubare per una notte in alcool denaturato a 95°, è stato poi incluso nelle cassette da biopsia (come filtri sono stati utilizzati pezzi di calze di nylon) e processato come un preparato istologico. I campioni così inclusi, sono stati tagliati e colorati con ematossilina-eosina, e successivamente sottoposti ad esame immunostochimico, utilizzando la metodica streptavidina-biotina-perossidasi. Gli anticorpi utilizzati sono quelli consigliati nella diagnostica neoplastica (CK, VIM, S100, Fattore VIII, ecc.) (Dako, Denmark).

RISULTATI E CONCLUSIONI :

I nostri risultati hanno mostrato che la concentrazione delle cellule sul vetrino era sufficientemente adeguata e i dettagli nucleari e citoplasmatici delle stesse risultavano ben evidenti.

Nei nostri campioni, inoltre, l'architettura degli aggregati cellulari, normalmente persa nelle operazioni di striscio, spesso era conservata, consentendoci il riconoscimento di quadri istologici che hanno permesso di effettuare una diagnosi più precisa (fig.1). In più, le indagini immunostochimiche hanno individuato con chiarezza i citotipi in esame, laddove la sola osservazione morfologica non aveva dato risultati certi (figs. 2, 3, 4, 5).

Tale metodica, da un punto di vista tecnico, risulta di facile attuazione, non richiede costi particolari per un laboratorio standard, ed è rapida. Inoltre, consente di utilizzare quantità ristrette di anticorpo, in quanto, a differenza del normale preparato citologico, il campione non risulta disperso sul vetrino, e permette di conservare a lungo il materiale citologico per poterne disporre anche in tempi successivi, a scopo diagnostico, didattico, o di ricerca.

In conclusione, la tecnica del cell-block, da noi modificata, associata ad indagini immunostochimiche, può essere considerata un valido strumento diagnostico nella citologia oncologica di routine.

BIBLIOGRAFIA :

Brifford M., Hache'ne K., Le Doussal V. : Immunohistochemistry on cell-blocks from fine-needle cytopunctures of primary breast carcinomas and lymph node metastases. *Modern Pathology* **13 (8)** : 841-853, 2000 ; Caniatti M., Roccabianca P., Marconi V., Scarpa P., Faverzani s., Gualtieri M.. *Tecnica del citoblocco in citologia veterinaria. Atti congresso Sisvet (vol. XLVII) pag. 885-889, 1993 ; Mayall F., Darlington A. and Harrison B. : Fine needle aspiration cytology in the diagnosis of uncommon types of lymphoma. *Journal of Clinical Pathology* **56** : 821-825, 2003.; Nga M. N.Lim g. L., Barbro N. and Chan N. HL. : Successful retrieval of fine-needle aspiration biopsy material from previously stained smears for immunocytochemistry : a novel technique applied to three soft tissue tumors. *Modern Pathology* **17** : 1-5, 2004; Nithyananda A. N., CFIAC, Narayan E., Sci B., Smith M., BS, Horn M.J., Sci M.: Cell block cytology improved preparation and its efficacy in diagnostic cytology. *American Journal of Clinical Pathology* **114** : 599-606, 2000.*

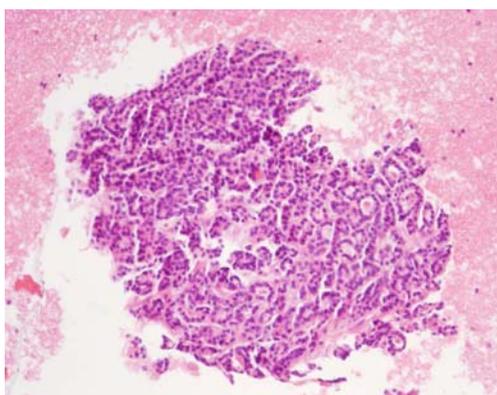


Figura 1 : Cane - Ago-aspirato da neof ormazione tiroidea : strutture follicolari contenenti colloide : CARCINOMA FOLLICOLARE (EE ; 200 X)

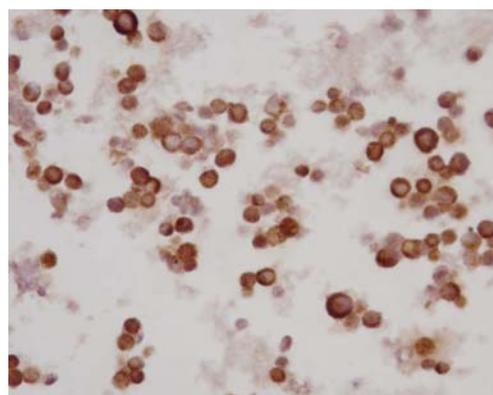


Figura 2 : Cane - Ago-aspirato da neof ormazione cutanea regione dorso : mast-cell + MASTOCITOMA (200 X)

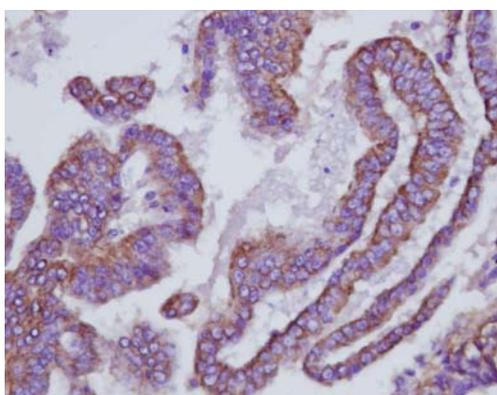


Figura 3 : Cane - Ago-aspirato da neof ormazione mammaria : CK + : CARCINOMA (200 X)

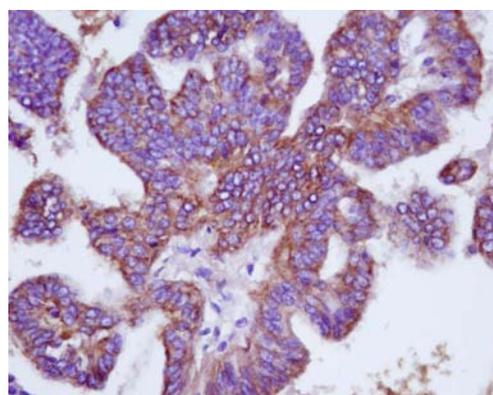


Figura 4 : Gatto - Ago-aspirato da neof ormazione mammaria : CK + : CARCINOMA (200 X)

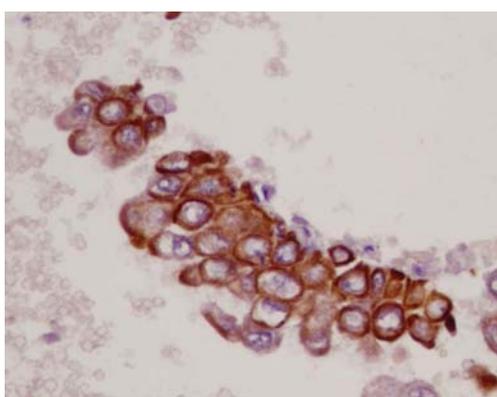


Figura 5 : Cane – sedimento urinario : CK + : CARCINOMA UROTELIALE (200 X)

SEDE	CANE	GATTO
TIROIDE	2	
MAMMELLA	2	2
FEGATO		1
URINE	1	
CUTE	3	1
PROSTATA	1	
VERSAMENTI		1
SCOLO NASALE	1	

Tabella 1. Casistica.

ESPRESSIONE DELLA CICLOOSSIGENASI-2 IN TESSUTI SANI, IPERPLASTICI E NEOPLASTICI DI CAGNA E DI GATTA: SIGNIFICATO PROGNOSTICO E CORRELAZIONE CON ANGIOGENESI

Millanta Francesca., Citi Simona¹, Della Santa D,¹Poli Alessandro

Dipartimento di Patologia Animale e ¹ Dipartimento di Clinica Veterinaria, Facoltà di medicina Veterinaria, Università di Pisa

La cicloossigenasi-2 (COX-2) è espressa in numerosi tumori dell'uomo, tra cui il carcinoma del colon e quello del seno. Questo isoenzima svolge un ruolo importante nella promozione della crescita neoplastica attraverso i suoi effetti sull'angiogenesi, la proliferazione cellulare e l'apoptosi. Lo scopo dello studio è valutare mediante immunohistochimica l'espressione di COX-2 in tessuti mammari sani, iperplastici e neoplastici di gatta e cagna e l'associazione di questo isoenzima con parametri clinico-patologici, espressione di recettori per estrogeno e progesterone (ER e PR), MIB-1, HER-2, microvessel density (MVD), VEGF e OS. In entrambe le specie non è stata osservata immunoreattività nei tessuti sani ed iperplastici. Il 96% dei carcinomi infiltranti di gatta ed il 100% di quelli di cagna sono risultati COX-2 positivi. Nella gatta è stata rilevata una correlazione inversa, statisticamente significativa, tra COX-2 ed espressione di ER (P= 0.04). L'espressione di COX-2 è inoltre risultata correlata con aumentata espressione di PR, (P=0.04), di VEGF (P=0.002) e con prognosi peggiore (P=0.002). Nella cagna l'espressione di COX-2 era correlata con overespressione di HER-2 (P=0.013), tumor grading (0.03) e ridotta OS (0.03). COX-2 è espressa nel tessuto mammario durante la progressione neoplastica e tale espressione risulta associata a prognosi peggiore. Nella specie canina COX-2 potrebbe giocare un importante ruolo nell'insorgenza di tumori mammari indotti da HER-2. La correlazione tra COX-2 ed angiogenesi suggerisce inoltre un ruolo potenziale dei COX-2 inibitori, per le loro proprietà antiangiogenetiche, nella prevenzione e nel trattamento dei carcinomi di gatta.

Parole chiave: COX-2, angiogenesi, tumori mammari, cane, gatto, prognosi.

CYCLOOXYGENASE-2 EXPRESSION IN FELINE MAMMARY HYPERPLASTIC AND NEOPLASTIC LESIONS: ITS PROGNOSTIC SIGNIFICANCE AND CORRELATION WITH ANGIOGENESIS.

Cyclooxygenase (COX)-2 is overexpressed in several human tumours including colon and breast carcinomas and may have a role in regulating tumour growth via effects on angiogenesis, cell proliferation and apoptosis. In this study COX-2 expression was evaluated by immunohistochemistry in healthy, hyperplastic and neoplastic feline and canine mammary and related to clinicopathological parameters, estrogen and progesterone receptor status (ER and PR), MIB-1, HER-2, microvessel density (MVD), VEGF and OS. In both species, COX-2 immunoreactivity was not observed in healthy and hyperplastic tissues, while 96% of feline and 100% of canine invasive carcinomas scored positive. In queens a significant inverse correlation was found between COX-2 and ER status (P= 0.04). COX-2 was also significantly correlated to increased PR expression (P=0.04) and to angiogenesis assessed by VEGF expression (P=0.002). In bitches, COX-2 expression showed a significant correlation with HER-2 overexpression (P=0.013) and tumour grading (P=0.03). An increased COX-2 expression was also correlated to OS in both dogs and cats (P=0.03 and 0.002, respectively). COX-2 is expressed in mammary tissues during tumorigenesis and its expression is associated with a poorer prognosis in bitches and queens. COX-2 may be important for mediating HER-2-induced canine mammary tumors. The correlation of COX-2 expression and angiogenesis provides support for a potential role of COX-2 inhibitors for the prevention and the treatment of feline IMCs via their antiangiogenic properties.

Key words: COX-2, angiogenesis, mammary tumors, dog, cat, prognosis.

ESPRESSIONE DEI RECETTORI PER ESTROGENI NELLA PROSTATA NORMALE, IPERPLASTICA E NEOPLASTICA DEL CANE

Grieco Valeria, Riccardi Elena, Rondena Marco, Somaschini Francesca, Finazzi Mario

DiPAV, Sezione di anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviare, Milano.

E' stato ipotizzato che gli estrogeni possano essere coinvolti nello sviluppo dell'iperplasia e nella cancerogenesi della prostata. Nell'uomo sono stati effettuati numerosi studi sull'espressione dei recettori per estrogeni nella prostata normale, iperplastica e neoplastica. Poiché nel cane, i lavori in merito, assai scarsi, risalgono alla fine degli anni '80 e non considerano le neoplasie, lo scopo di questo lavoro è quello di valutare l'espressione dei recettori per estrogeni in carcinomi prostatici di cane. Sezioni provenienti da 2 prostate normali, 2 prostate iperplastiche e da 10 carcinomi prostatici sono state sottoposte ad esame immunohistochimico (metodo ABC) per la ricerca dei recettori per estrogeni impiegando un anticorpo policlonale diretto contro i recettori umani (diluizione 1:150). In ciascuna sezione riferibile a tumore erano presenti parti di tessuto uretrale e/o prostatico normali per controllo della reattività. E' stata poi effettuata un'analisi di immagine considerando per ciascuna sezione almeno 500 cellule neoplastiche e valutando la percentuale di cellule immunopositive. La positività immunohistochimica, si rinveniva a carico di tutte le cellule epiteliali, si riscontrava nel nucleo che, nelle sezioni riferibili a prostate normali ed iperplastiche, appariva sempre uniformemente colorato. Per contro, nelle lesioni neoplastiche si osservava un calo della percentuale di cellule positive le quali non superavano mai il valore di 66.73%. Inoltre, la positività era talora disomogenea e limitata solo ad alcune porzioni dei nuclei stessi. Nel presente lavoro viene dimostrata la presenza di recettori per estrogeni nei tumori prostatici del cane. Tuttavia, in molti dei casi esaminati si notava un sensibile calo della percentuale di cellule positive. Questo dato conferma l'elevato grado di indifferenziazione tipico dei carcinomi prostatici canini, soprattutto in comparazione con quelli umani dove si riscontrano percentuali di positività spesso più elevate.

Parole chiave: cane, prostata, estrogeni, recettori.

ESTROGEN RECEPTOR EXPRESSION IN NORMAL, HYPERPLASTIC AND NEOPLASTIC CANINE PROSTATE

It has been suggested that estrogens and their receptors may be involved in the development of prostate cancer. In man, the expression of estrogen receptors have been studied in normal, hyperplastic and neoplastic prostate. To elucidate the role of estrogen receptor in canine prostate cancer development 2 normal, 2 hyperplastic and 10 neoplastic canine prostate were considered. Sections from all the samples were immunolabelled (ABC method) with a polyclonal antibody directed against human estrogen receptors. The percentage of positive cells were assessed by digital image analysis. Immunoreactivity was observed in all epithelial cells of normal and hyperplastic prostates while it was consistently reduced in all neoplastic cases, ranging from 18.9 to 66.7. Moreover the signal of nuclear labelling in carcinomas was frequently partial and/or disomogeneous. These findings demonstrate that canine prostatic carcinomas are less differentiated than the human counterpart that generally shows higher level of estrogen receptors expression.

Key words: dog, prostate, estrogen, receptors.

**ESPRESSIONE IMMUNOISTOCHEMICA DEL RECETTORE PER ANDROGENI NELLE GHIANDOLE
EPATOIDI SANE E NEOPLASTICHE DI CANE**

Pisani G.¹, Millanta Francesca², Lorenzi D.², Verin R.², Vannozzi I.³, Poli Alessandro²

1 Libero professionista, Sarzana, Italia; 2 Dipartimento di Patologia Animale e 3 di Clinica Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Pisa, Italia

I tumori delle ghiandole perianali sono frequenti nella specie canina, specialmente nel maschio. L'insorgenza di tali neoplasie sembra essere ormono-dipendente e la sola castrazione, senza escissione, ha dimostrato di favorire la regressione spontanea di adenomi. Lo scopo del nostro studio è pertanto di valutare l'espressione di recettori per androgeni (AR) in tessuto ghiandola epatoide sano, iperplastico e neoplastico di cane. Sono stati esaminati 35 campioni di tessuto epatoide, classificati secondo i criteri del WHO (1998) e rappresentati da 5 campioni di tessuto sano, 10 iperplasie, 8 adenomi e 12 carcinomi. L'espressione di AR è stata valutata mediante immunostochimica con il metodo streptavidina-biotina perossidasi e quantificata come percentuale di nuclei positivi. E' stata valutata anche l'intensità dell'immunoreattività. L'espressione di AR è stata osservata nel 100% dei tessuti sani, iperplastici e negli adenomi. Undici/12 (92%) carcinomi erano ancora positivi. La percentuale di nuclei immunoreattivi è risultata maggiore nel tessuto sano ed iperplastico che negli adenomi e nei carcinomi. E' stata osservata una immunoreattività di debole, moderata o forte intensità. Questi risultati, sebbene preliminari, suggeriscono una possibile dipendenza dagli androgeni anche per i carcinomi delle ghiandole epatoide. Anche se risulta opportuno confermare l'influenza di un background ormonale reclutando un numero maggiore di casi, la castrazione o la terapia ormonale potrebbero risultare utili in soggetti con carcinoma delle ghiandole perianali.

Parole chiave: cane, immunostochimica, recettori per androgeni, tessuto delle ghiandole epatoide sano, iperplastico e neoplastico.

**IMMUNOHISTOCHEMICAL EXPRESSION OF ANDROGEN RECEPTOR IN CANINE HEALTHY AND
NEOPLASTIC HEPATOID GLANDS**

Neoplasms of the perianal gland are common in the dog, particularly the male. The occurrence of these tumours appears to be hormone related and castration, without excision, has sometimes proved to favour regression of perianal adenomas. The aim of this study was to investigate the expression of androgen receptors (AR) in canine healthy, hyperplastic and neoplastic hepatoid glands. Thirty five samples of canine hepatoid gland tissues were investigated. The lesions, classified according to WHO (1998) criteria, were 5 healthy hepatoid glands, 10 hyperplastic tissues, 8 adenomas, and 12 carcinomas. The AR expression was investigated by immunohistochemistry using a streptavidin-biotin peroxidase method. The immunoreactivity was scored by two pathologists according to the percentage of positive nuclei and the intensity of staining. AR expression was observed in 100% of healthy and hyperplastic tissues and adenomas, and 11/12 (92%) carcinomas were still positive. The percentage of positive nuclei was higher in healthy tissues and hyperplastic tissues than in adenomas and adenocarcinomas. The staining intensity was either weak, moderate or strong. These preliminary results seem to suggest an androgen dependence also for hepatoid gland carcinomas. Although further studies may be required to evaluate the hormonal background of these diseases, also dogs bearing those carcinomas may benefit from castration or hormonal conventional therapy.

Key words: Androgen receptor, dog, healthy, hyperplastic, and neoplastic hepatoid gland tissues, immunohistochemistry.

ESPRESSIONE DELLA PROTEINA HER-2/C-ERBB-2 NEI MENINGIOMI DEL CANE E DEL GATTO

Millanta Francesca, Salvadori Claudia, Poli Alessandro, Cantile Carlo

Dipartimento di Patologia Animale – Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Pisa

La proteina HER-2/neu è un recettore transmembranario ad attività tirosino-chinasica implicato nello sviluppo delle neoplasie. La sovraespressione di questa proteina è determinata dall'amplificazione del protooncogene c-erbB-2 ed è stata studiata con metodiche immunoistochimiche nei tumori mammari del cane e del gatto. In questo studio è stata valutata l'espressione del c-erbB-2 in 41 meningiomi, di cui 23 nel cane e 18 nel gatto. I cani erano di età compresa tra 3½ e 12 anni (media=8,6), mentre l'età dei gatti variava da 4 a 21 anni (media=11,5). I soggetti erano 22 maschi e 19 femmine e la localizzazione del meningioma era intracranica in 36 soggetti ed extracranica nei rimanenti 5. Istologicamente le neoplasie sono state classificate in meningioma transizionale (15 casi), meningoteliale (10), papillare (7), psammomatoso (5), fibroblastico (1), mixoide (1), a cellule granulose (1) e anaplastico (1). Nel cane il tipo istologico più frequentemente osservato è stato il meningoteliale e nel gatto il transizionale. La sovraespressione della proteina HER-2/neu è stata dimostrata in 7 casi (17,07%) e non sono state evidenziate correlazioni in base alla specie, età, sesso, localizzazione della neoplasia e tipo istologico. Questo studio rappresenta un'indagine preliminare che dimostra la presenza di sovraespressione di HER-2/neu anche nel meningioma del cane e del gatto e quindi questo marker potrebbe essere utilizzato per individuare selettivamente i soggetti da sottoporre ad una specifica terapia anti-HER-2.

Parole chiave: cane, gatto, HER-2/neu, immunoistochimica, meningioma.

HER-2/C-ERBB-2 PROTEIN EXPRESSION IN CANINE AND FELINE MENINGIOMAS.

HER-2/neu is a transmembrane receptor with intrinsic tyrosine-kinase activity believed to play important roles in cancer development. The overexpression of this protein is caused by the amplification of the HER-2 (c-erbB-2) protooncogene. The role of the protooncogene and its receptor has been investigated in canine and feline mammary carcinomas by immunohistochemical procedure. To determine whether abnormal expression of this gene also plays a role in the pathogenesis of meningiomas, we analysed the expression of the c-erbB-2 in 23 canine and 18 feline meningiomas. The age of the animals ranged from 3.5 to 12 years in dogs (mean age=8.6), and from 4 to 21 years in cats (mean age=11.5). The 41 cases of meningioma were almost equally divided between male (22) and female (19). Tumor localization was intracranial in 36 cases and extracranial in 5 cases. Histologically, tumor types were transitional (15), meningotheliomatous (10), papillary (7), psammomatous (5), fibroblastic (1), myxoid (1), granular cell (1) and anaplastic (1). The meningotheliomatous and transitional meningiomas were the major histological types in dogs and cats, respectively. HER-2/neu overexpression was detected in 7 of 41 (17.07%) meningiomas and was not significantly correlated to species, age, gender, localization and histological type. Although a larger study is required to strengthen the predictive ability of this marker, the assessment of HER-2/neu overexpression can be considered as a possible tool for the selection of patients who are likely candidates for specific anti-HER-2 therapy.

Key words: dog, cat, HER-2/neu, immunohistochemistry, meningioma.

INCIDENZA DELLE NEOPLASIE TESTICOLARI CANINE IN LOMBARDIA NEL PERIODO 1994-2004

Riccardi Elena, Grieco Valeria, Iermanò Vittoria, Teruzzi Fabio, Finazzi Mario

DiPAV, Sezione di anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviare, Milano

L'incidenza delle neoplasie testicolari nel cane è più alta rispetto a quella riscontrata negli altri animali domestici e sembra essere più frequente nei soggetti anziani. A seconda della loro origine le neoplasie testicolari nel cane sono denominate seminomi, sertoliomi ed interstiziomi. L'incidenza dei tumori testicolari nell'uomo ha subito un continuo incremento durante l'ultimo secolo e la forma più frequente è rappresentata dal seminoma. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di descrivere da un punto di vista epidemiologico e morfologico le neoplasie testicolari della specie canina riscontrate nell'arco di un decennio (1994-2004). Sono stati esaminati entrambi i testicoli prelevati, in sede necroscopica, da 233 cani maschi pervenuti al nostro Dipartimento tra il 1994 e il 2004. Gli animali compresi in tale studio non presentavano segni di patologia testicolare. I testicoli sono stati valutati macroscopicamente in sezione di taglio e le eventuali lesioni campionate. Nel caso di assenza di lesioni, veniva campionata una sezione rappresentativa per ciascun testicolo. I campioni sono stati fissati in formalina al 10%, processati per l'esame istologico, sezionati e colorati con Ematossilina-Eosina. La maggior parte degli animali con tumore era di età compresa tra i 10 e 15 anni. E' stata evidenziata la presenza di una neoplasia testicolare a carico di almeno uno dei due testicoli nel 25.75 % (60/233) degli animali esaminati. Tuttavia, il numero totale di neoplasie riscontrate è stato di 111. Infatti, più di un terzo dei soggetti (24/60) presentava un tumore in entrambi i testicoli. Sono stati diagnosticati 45 casi di seminoma, 55 di interstizioma e 11 casi di sertolioma. In 20 dei 60 animali è stata rilevata la presenza di più di un tipo di tumore testicolare con le seguenti combinazioni: seminoma/interstizioma (9 casi), interstizioma/sertolioma (5 casi) e seminoma/sertolioma (4 casi). I risultati ottenuti confermano che le neoplasie testicolari sono tipiche del cane anziano e che la loro incidenza in Lombardia risulta essere piuttosto elevata e in progressiva crescita. Tanto in medicina umana che in quella veterinaria i fattori di rischio che predispongano a tali patologie non sono a tutt'oggi noti.

Parole chiave: cane, testicolo, tumori, incidenza.

INCIDENCE OF CANINE TESTICULAR TUMORS IN LOMBARDY AMONG 1994-2004

Testicular neoplasias (seminoma, sertolioma and Leydig cells tumour) are a common findings in aged dog. The aim of this investigation was to study the epidemiology and morphology of spontaneous canine testicular tumours. Data were collected at necropsy from 233 dogs between 1994 and 2004. Both the testis were formalin fixed and routinely processed for histological analysis. Histological examination revealed a total of 111 testicular tumours distributed within 60 out of 233 examined. Seminoma and Leydig cell tumour were present respectively in 45 and 55 subjects while sertolioma occurred only in 11 dog. Bilateral tumours were recovered in 24 out of 60 dogs. 20 dogs showed more than one type of testicular tumour. The combination of seminoma and Leydig cell tumour was more frequently observed (9 cases). In conclusion, testicular neoplasia is a common finding in old dogs in Lombardy. Further studies are required to elucidate the possible predisposing factors to the development of these tumours.

Key words: dog, testis, tumors, incidence.

TUMORI PRIMITIVI DEL POLMONE NEL GATTO: INDAGINI IMMUNOISTOCHEMICHE

Bacci Barbara, Marcato Paolo Stefano

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

I tumori primitivi del polmone sono estremamente rari nel gatto. In letteratura sono stati descritti prevalentemente carcinomi adenosquamosi e carcinomi bronchioloalveolari, mentre altre forme sono state diagnosticate solo occasionalmente. Sono stati studiati 14 tumori primitivi del polmone osservati nel corso degli ultimi 20 anni. Le neoplasie sono state riclassificate secondo lo schema proposto dalla WHO-ICTDA in base alle caratteristiche istologiche, istochimiche ed immunohistochemiche. Sono stati diagnosticati 3 carcinomi squamosi, 2 carcinomi bronchioloalveolari, 1 carcinoma a grandi cellule, 3 carcinomi adenosquamosi, 3 adenocarcinomi (1 papillare, 2 acinosi), e 2 carcinomi delle ghiandole bronchiali. I 14 soggetti in esame (3 persiani e 11 europei, 8 maschi e 6 femmine) avevano un'età compresa fra 3 e 15 anni. Tra i soggetti osservati, 9/14 casi presentavano metastasi a distanza, e 2/14 solo ai linfonodi regionali. Le indagini immunohistochemiche sono state eseguite con un ampio pannello di anticorpi (VIM, CK AE1/AE3, CK 5/6, HBME1-1, Cad-E e CK 19) con metodo ABC. Sono risultati positivi 3/14 casi per VIM; 14/14 per CK AE1/AE3; 2/14 per CK 5/6; 3/14 per HBME-1; 6/14 per Cad-E e 12/14 per CK19. In base ai risultati ottenuti le diagnosi sono state confermate. L'espressione di CK AE1/AE3 è stata riscontrata in tutti i casi, seppure con intensità minore nelle forme squamose. La VIM è risultata positiva nelle forme carcinomatose indifferenziate; HBME-1 e CK5/6, utilizzati per la diagnosi differenziale con i mesoteliomi pleurici, sono risultati positivi in una bassa percentuale di casi. La positività a CK19, contrariamente ai risultati attesi, è stata riscontrata nella maggior parte dei casi esaminati.

Parole chiave: Tumori polmonari, gatto, immunohistochemica.

PRIMARY LUNG TUMOURS IN CATS: IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY.

Primary tumours of the lung are uncommon in cats. Adenosquamous carcinomas and bronchioloalveolar carcinomas are the most frequent histological types documented in cats, whereas the occurrence of other tumour types is rare. In the present report, 14 primary pulmonary tumours were studied. Tumours were classified according to the criteria established by the WHO-ICTDA, and the classification was based on histological, histochemical and immunohistochemical findings. 3 squamous carcinomas, 2 bronchioloalveolar carcinomas, 1 large cell carcinoma, 3 adenosquamous carcinomas, 3 adenocarcinomas and 2 bronchial glands carcinomas were diagnosed. The age range of the cats examined (3 persians and 11 shorthaired, 8 males and 6 females) varied from 3 to 15 years. 9/14 cases metastatized to other sites, and 2/14 metastatized to the regional lymphnodes. Immunohistochemistry was performed with an antibody panel (VIM, CK AE1/AE3, CK 5/6, HBME1-1, Cad-E e CK 19), and with an ABC method. 3/14 cases were positive for VIM; 14/14 for CK AE1/AE3; 2/14 for CK 5/6; 3/14 for HBME-1; 6/14 for Cad-E e 12/14 for CK19.

The expression of CK AE1/AE3 was strong in the majority of cases, while squamous carcinomas showed a weak positivity. The reactivity to VIM was found in undifferentiated carcinomas. Anti mesothelial-antibodies such as HBME-1 and CK5/6 labelled a low percentage of cases, whereas CK19 immunopositivity was found in a high percentage of cases.

Key words: Pulmonary tumours, cat, immunohistochemistry.

MELANOMA IRIDEO DIFFUSO FELINO (FDIM): SIGNIFICATO DELLE CARATTERISTICHE ISTOLOGICHE ED IMMUNOISTOCHEMICHE QUALI INDICATORI PROGNOSTICI

Giudice Chiara, Rondena Marco, Grieco Valeria, Greppi Gianfranco, Dubielzig R. Richard.

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

Il melanoma irideo diffuso (FDIM) è il tumore maligno intraoculare primario più frequente nel gatto. Nell'uomo questo tumore è considerato raro, ma ad elevato potenziale metastatico. Scopo del nostro studio è quello di definire il possibile significato prognostico di alcune caratteristiche istologiche ed immunoistochimiche del FDIM. Dall'archivio dell'università del Wisconsin (COPLW) sono stati selezionati 24 globi oculari con precedente diagnosi istologica di melanoma irideo, prelevati chirurgicamente da altrettanti gatti, 15 maschi e 9 femmine, di età compresa tra 3 e 13.5 anni. Le caratteristiche istomorfologiche, con particolare riferimento a morfologia cellulare, invasione dei tessuti circostanti ed indice mitotico (10 e 40 HPF, 40x) sono state valutate su sezioni colorate con Ematossilina-Eosina. Sezioni seriate sono state immunocolorate (metodo ABC standard) con anticorpi anti Melan-A, CD3 e Ki-67. I dati clinici e di sopravvivenza sono stati forniti dagli oftalmologi referenti. Per l'indagine statistica i dati ottenuti sono stati analizzati con test KW one-way ANOVA, e Tukey/Kramer post hoc test ($P < 0.05$). Tra le caratteristiche morfologiche valutate, solo l'indice mitotico, valutato su 40 HPF, è risultato significativamente associato ai dati di sopravvivenza. Nessun significato prognostico era invece attribuibile alle caratteristiche citologiche delle cellule neoplastiche. Nessuno dei marker immunoistochimici valutati è risultato significativamente associato ai tempi di sopravvivenza, anche se l'indice di proliferazione (Ki67) è risultato mediamente più alto nelle neoplasie dei soggetti con tempo di sopravvivenza minore. I nostri risultati sono simili a quelli ottenuti nel melanoma irideo dell'uomo. Ulteriori studi saranno tuttavia necessari per definire il reale significato dell'indice di proliferazione Ki67 nel melanoma irideo felino.

Parole chiave: melanoma, iride, gatto, Ki67, Melan A

FELINE DIFFUSE IRIS MELANOMA (FDIM): SIGNIFICANCE OF HISTOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL CHARACTERISTICS AS PROGNOSTIC INDICATORS.

Diffuse iris melanoma is the most common primary malignant ocular neoplasm of cats and it is a rare, malignant tumor in humans. Aim of this study was to investigate histological and immunohistochemical characteristic of FIM as possible prognostic indicators. 24 paraffin embedded feline globes affected by FIM, from 24 cats, 15 males/9 females, aged 3-13.5 years, were retrieved from the archives of the Comparative Ocular Pathology Laboratory of Wisconsin (COPLW). Cell morphology, scleral invasion and mitotic index (10 and 40 HPF, 40x) were determined on HE stained sections for each tumor. Immunohistochemistry was performed with monoclonal antibodies anti Melan-A, CD3 and Ki67 (standard ABC method). Follow up data were obtained from referring ophthalmologists. Data were analyzed with the one-way ANOVA test, followed by the Tukey/Kramer post hoc test ($P < 0.05$). When morphologic characteristics were considered, only mitotic count, evaluated on 40 HPF, was significantly associated with better prognosis. No association between overall survival and cell morphology was observed. None of the immunohistochemical markers was significantly associated with survival data, although Ki67 proliferation index was higher in cats with shorter overall survival. Our data are consistent with results obtained in human iris melanoma studies. Further investigations on more homogeneous group of tumors (e.g. equal time between first anomaly and enucleation) will be held to define the significance of Ki67 proliferation index in feline diffuse iris melanoma.

Key words: melanoma, iris, feline, Ki67, Melan A.

UN CASO DI TUMORE NEUROECTODERMICO PRIMITIVO PERIFERICO (PPNET) IN UN CANE

Rossetti Enrica* Amati Alessandro^o e Castagnaro Massimo*

**Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Padova*

^oLibero Professionista, Bologna

Il termine tumore neuroectodermico primitivo periferico p(PNET), rappresenta un gruppo di neoplasie rare derivanti probabilmente dalla cresta neurale. Il cane, un Pointer femmina di 2 anni, è stato riferito per anoressia da due giorni. All'esame fisico il soggetto appariva depresso, ed è stata rilevata un'estesa neoformazione palpabile in addome. Gli accertamenti emocromocitometrico e biochimico non hanno evidenziato alterazioni. Radiografie di addome e torace hanno evidenziato la presenza di neoformazioni multiple. Il cane è stato sottoposto a laparotomia esplorativa. È stata evidenziata una neoformazione multinodulare del diametro di circa 15 cm, adiacente ai reni ed in contiguità con le anse digiunali. Considerato il grave coinvolgimento multisistemico è stata effettuata l'eutanasia in sede intraoperatoria. All'esame necroscopico erano presenti formazioni analoghe nello spessore del diaframma e nel parenchima polmonare. I preparati citologici allestiti hanno consentito di evidenziare una popolazione omogenea caratterizzata dalla presenza di numerosi nuclei nudi. All'esame istopatologico era presente una popolazione atipica composta di elementi poligonali con moderato citoplasma chiaro, nucleo ovale centrale con cromatina finemente dispersa ed un nucleolo evidente. Si rilevavano aree necrotiche multifocali. Le diagnosi differenziali considerate sono state: neoplasie mesenchimali rotondocellulari, il gruppo dei tumori neuroectodermici primitivi (PNET-Sarcoma di Ewing) ed il sarcoma sinoviale. Si sono effettuate indagini istochimiche (Giemsa, PAS, PAS diastasi, Grimelius), immunostochimiche (cytokeratin, vimentin, S-100, CD99, EMA, SMA, melan-A, neurofilament protein, NSE, synaptophysin, GFAP) ed ultrastrutturali. La popolazione neoplastica è risultata positiva a CD99, vimentin, NSE, synaptophysin, e neurofilament protein. Sulla base dell'età del cane, la storia clinica, la distribuzione delle lesioni, le caratteristiche cito/istologiche e le indagini immunostochimiche, è stata formulata una diagnosi di tumore neuroectodermico primitivo periferico p(PNET).

Parole chiave: tumore neuroectodermico primitivo, cane, immunostochimica.

A CASE OF PERIPHERAL PRIMITIVE NEUROECTODERMAL TUMOUR (PPNET) IN A DOG.

Peripheral PNET is a rare group of neoplasms presumably derived from surviving neuroepithelial cells. In the PNS they are thought to arise from neuroectodermal cells of the neural crest. A 2 years old female pointer was referred for severe anorexia since two days. At physical examination the dog was depressed and the clinician revealed a huge abdominal mass. Radiographs of the abdomen confirmed the presence of a retroperitoneal mass obscuring all details. Blood exams were unremarkable and an explorative laparotomy was performed. On abdominal examination there was a retroperitoneal multinodular mass adjacent to the kidney and the jejunum. Based on the poor conditions of the dog, the owner decided for euthanasia. At necropsy during thoracic examination both the lung and both sides of the diaphragm appeared involved by the same masses. Several specimens for cytology and histopathology were taken. Cytological examination revealed a moderately cellular, naked nuclei appearance of the sample. On histology the neoplasm was built up by a fairly uniform population of round to oval cells with moderate amount of acidophilic cytoplasm and round nucleus with finely stippled chromatin. Multifocal areas of necrosis were present associated with neutrophilic infiltrate. Special stains (Giemsa, PAS, PAS diastasi, Grimelius), immunohistochemistry (cytokeratin, vimentin, S-100, CD99, EMA, SMA, melan-A, neurofilament protein, NSE, synaptophysin, GFAP) and electron microscopy were performed. Neoplastic cells were positive for CD99, vimentin, NSE, synaptophysin, e neurofilament protein. Based on the age of the dog, the clinical history, the distribution of gross lesions, cyto/histological and immunohistological findings, a diagnosis of a peripheral primitive neuroectodermal tumour (pPNET) was made.

Key words: primitive neuroectodermal tumour, dog, immunohistochemistry.

UN RARO CASO DI SARCOMA GRANULOCITICO IN UN CANE: OSSERVAZIONI ISTOPATOLOGICHE, ISTOCHEMICHE ED IMMUNOISTOCHEMICHE

Pirino Salvatore, Anfossi Antonio, Rocca Stefano, Casula Gabriella, Idili Stefania, Sanna Maria Paola *Onida Angela, *Mura Antonica.

*Istituto di Patologia Generale, Anatomia Patologica e Clinica Ostetrico-Chirurgica Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria. *Istituto di Anatomia e Istologia Patologica, Facoltà di Medicina. Università degli Studi di Sassari*

Il Sarcoma Granulocitico è un tumore solido maligno, extramidollare, composto da precursori dei granulociti a vario grado di differenziazione. Si considerano tre livelli di differenziazione: blastico, immaturo e differenziato, e rari casi con morfologia atipica. Attualmente l'ausilio di tecniche sempre più sofisticate consente di differenziare i vari istotipi.

In questa nota abbiamo ritenuto interessante riferire su un caso, pervenuto alla nostra attenzione, di un cane Schnautzer femmina di 5 anni, deceduto in seguito a una grave dispnea. Il veterinario accertava in sede autoptica la presenza di numerose neoformazioni in ambito polmonare. Si riscontrava una voluminosa neoplasia mediastinica di colore bianco grigiastro, adesa alla trachea, e numerose altre nel contesto del parenchima. Diversi campioni venivano fissati in formalina, inclusi in paraffina e sottoposti a colorazioni istochimiche (H.E., Giemsa), citochimiche (Naphthol-AS-D-Chloroacetate) ed immunostochimiche (anti-CD3, -CD79a, -CD45, -MPO, -CD45Ro, -CD34, -CD20, -CD68, -CD15, -CD30, -CD117, -CD235a, -Fattore VIII, -elastasi e anti-Pan-citocheratine).

La neoplasia, scarsamente circoscritta, era costituita da un tappeto di granulociti neutrofili con vario grado di differenziazione, fra i quali si osservavano numerosi elementi della linea mieloide.

La positività diffusa all'MPO e focale alla Naphthol-AS-Dichloroacetato, consentiva di escludere i linfomi, i carcinomi a piccole cellule e i tumori di origine monocitica ed eritroide, e di formulare la diagnosi di Sarcoma Granulocitico neutrofilico, di tipo immaturo con progressione verso la forma matura, patologia questa, in campo Veterinario estremamente rara.

Parole Chiave: Sarcoma Granulocitico neutrofilico, Polmone.

HISTOPATHOLOGICAL, HISTOCHEMICAL AND IMMUNOISTOCHEMICAL STUDY ON A RARE CASE OF GRANULOCYTIC SARCOMA IN A DOG.

Granulocytic Sarcoma is a malignant extramedullary solid tumor, composed of granulocytic precursor cells at various levels of differentiation. Three differentiation levels are considered: blastic, immature, and differentiated, and cases with unusual morphology. Nowadays the aid of more and more highly developed techniques allows to differentiate the various histotypes.

We report a case of a 5 year-old female Schnautzer dog, died after a serious dyspnoea. During the autopsy the veterinary found several neoplasias in the lungs. It has been found a very large white-greyish mediastinal neoplasia, stuck at the trachea and several more in the parenchyma. Several samples were fixed in formalin, embedded in paraffin and exposed to histochemistry staining (H.E., Giemsa), cytochemistry (Naphthol-AS-D-Chloroacetate), and immunohistochemistry (anti-CD3, -CD79a, -CD45, -MPO, -CD45Ro, -CD34, -CD20, -CD68, -CD15, -CD30, -CD117, -CD235a, -Factor VIII, -elastase and anti-Pan-cytocheratine).

Neoplasia, poorly circumscribed, was composed by a large number of neutrophil granulocytes with different degrees of differentiation, including elements of myeloid lineage.

Cells were positive to MPO and focal to Naphthol-As-D-Chloroacetate and were negative to all the others antisera, allowing us to exclude lymphomas, small cells carcinomas, and tumors of monocytic and erythroid origin. By these characteristics we could diagnose a rare case of neutrophilic Granulocytic Sarcoma, of immature type progressing to mature form.

Key Words: Neutrophilic Granulocytic Sarcoma, Lung.

INTRODUZIONE

Il Sarcoma Granulocitico, chiamato anche Sarcoma Mieloide o, come viene riportato in alcuni testi di medicina umana, Cloroma per la colorazione verdastra impartita dall'attività della perossidasi alla superficie di taglio fresca a molte di queste forme tumorali, è un tumore solido extramidollare composto da elementi della linea mieloide con vario grado di differenziazione. Tra le cellule di origine mieloide è raro che megacariociti e precursori eritroidi diano origine a

Associazione Italiana di Patologia Veterinaria

neoformazioni extramidollari, mentre granulociti e monociti sono le cellule chiamate in causa nel determinismo di queste forme tumorali e per questo motivo alcuni autori preferiscono il termine meno specifico di Sarcoma Mieloide. Frequente nell'Uomo in età giovanile, abitualmente associato ad altre forme neoplastiche come la Leucemia Mieloide Acuta (AML), Leucemia Mieloide Cronica (CML) e con altri disordini mieloproliferativi come la Mielofibrosi Idiopatica Cronica, la Sindrome Ipereosinofila e la Policitemia Vera. Può interessare tutti i distretti anatomici con maggior frequenza per le orbite, il tratto genitale maschile e femminile, i linfonodi, la pelle, le ossa e i tessuti molli. Negli animali è segnalato nel cane, bovino, coniglio e cocorita con predilezione diversa per la sede. Infatti nel cane pare che il polmone, l'intestino e la pelle siano gli organi più frequentemente colpiti, mentre nel bovino viene segnalato a carico dell'apparato scheletrico, nel coniglio con sede cutanea e nella cocorita con localizzazione intestinale. Lo scopo di questo lavoro è quello di descrivere un raro caso di sarcoma granulocitico con localizzazione polmonare in un cane Schnautzer femmina di 5 anni d'età.

MATERIALI E METODI

I dati anamnestici in nostro possesso erano scarsissimi, infatti il veterinario ha potuto rilevare solo una grave dispnea a cui è seguita in breve tempo la morte. Dopo aver effettuato l'indagine autoptica si è rivolto al nostro istituto per il riscontro di formazioni neoplastiche in ambito toracico. Diversi campioni venivano fissati in formalina al 10%, inclusi in paraffina, sezionati a 3 μ di spessore e colorati con H.E. Dagli stessi campioni sono state ottenute le sezioni sottoposte successivamente ad indagine immunohistochimica mediante la tecnica dell'immunoperoxidasi. Gli algoritmi anticorpali utilizzati, le diluizioni e gli eventuali metodi di smascheramento dell'antigene vengono riportati nella tabella 1. Inoltre sono state effettuate anche due colorazioni citochimiche, la Naphtol-ASD-chloracetate, specifica per granulociti neutrofili e mastzellen, e il Giemsa utile per l'evidenziazione dei granuli eosinofili, al fine di evidenziare la linea di differenziazione e il livello di maturazione della neoplasia.

RISULTATI

Il polmone si presentava aumentato in peso e consistenza ed in sede mediastinica era evidenziabile una voluminosa massa neoplastica infiltrante i tessuti circostanti, con superficie irregolare, consistenza lardacea e colore grigiastro (foto 1). La superficie di taglio presentava un colore bianco-grigiastro, aspetto lobulato e la presenza di aree necrotiche ed emorragiche (foto 2). In ambito polmonare, numerose altre neoplasie del medesimo aspetto si potevano osservare in forma di spessi manicotti peribronchiali in parte confluenti fra loro (foto 3). L'esame istologico mostra una lesione scarsamente circoscritta, con carattere nodulare, separata da fibre collagene (foto 4). L'infiltrazione cellulare ha determinato il sovvertimento delle strutture proprie dell'organo rendendo irricognoscibili gli spazi e i setti alveolari, mentre sono ancora osservabili le cartilagini bronchiali (foto 5). La popolazione cellulare era composta da una prevalenza di granulociti neutrofili con vario grado di maturazione tra i quali erano evidenti elementi della linea mieloide, di aspetto pleomorfo, con nucleo da rotondeggiante a segmentato e la presenza di tre o più nucleoli e citoplasma eosinofilo (foto 6). L'indagine immunohistochimica si rivelava negativa nei confronti dei marker linfoidi, inclusi l'antigene comune dei linfociti (LCA), i marker per le cellule T (CD3, CD45RO, CD30) e per le cellule B (CD79a, CD20), permettendoci di escludere l'origine linfoide della neoplasia (foto 7-8-9). Risultavano negativi anche i markers: CD68 (istiocito-monocitica) ed Elastasi (monociti), CD117 (mastocitica), Fattore VIII (megacariociti) che ha comunque espresso la sua positività per le cellule dell'endotelio vasale, Glicoforina (linea eritroide) e CD34(precursori ematopoietici), e il CD15 (Granulociti circolanti e tissutali). (foto 10-11-12). L'indagine IHS è stata estesa anche alla possibile origine epiteliale mediante l'anticorpo anti Pan-CK che è risultato negativo. Le cellule tumorali si presentavano invece fortemente positive all'MPO, espressa da mieloblasti e granulociti neutrofili (foto 13-14). La focale positività alla colorazione con Naphtol-ASD-chloracetate e la negatività al Giemsa confermava ulteriormente la differenziazione neutrofilica della neoplasia (foto 15).

DISCUSSIONE

Il Sarcoma Granulocitico è ben studiato nell'uomo, dove è riportato nel 3-9% dei pazienti con Leucemia Mieloide Acuta (AML) e Leucemia Mieloide Cronica (CML) e il 60% di questi casi è rappresentato da soggetti con età inferiore ai 15 anni. Il sarcoma granulocitico ha un comportamento singolare, infatti può presentarsi come massa solida isolata o multipla in soggetti senza nessun altro segno di malattia, anticipare di parecchi mesi o anni il riscontro ematologico di una leucemia, presentarsi in concomitanza con una di queste e, infine, essere l'unico segno di una ricaduta. Le classificazioni istopatologiche considerano tre livelli di differenziazione: Blastico: composto principalmente da blasti e con scarsi aspetti di differenziazione allo stadio promieloblastico; immaturo: composto principalmente da mieloblasti e promielociti; differenziato: composto principalmente da promielociti e dagli ultimi stadi di maturazione mieloide. Spesso, nei soggetti non leucemici, le forme scarsamente differenziate vengono diagnosticate erroneamente come Linfoma a grandi cellule, Linfoma linfoblastico, Linfoma di Burkitt e più raramente come Carcinoma anaplastico. Una

diagnosi corretta richiede l'impiego sia di metodiche immunocitochimiche che citochimiche. La bibliografia riguardante gli animali si è rivelata veramente esigua e aspecifica, ed indica che nel cane gli organi maggiormente interessati sono risultati essere, nell'ordine, il polmone, l'intestino e la pelle. Nei soggetti colpiti, che si presentano inizialmente aleucemici, presenta gradi di differenziazione variabile.

CONCLUSIONE

Come precedentemente accennato, il veterinario curante non ha avuto la possibilità di raccogliere dati anamnestici per il precoce decesso dell'animale e, inoltre, effettuando esso stesso l'indagine autoptica ha precluso la possibilità di approfondire l'indagine su altri organi ed in particolare il midollo, per evidenziare il possibile stato leucemico del soggetto. Le indagini immunocitochimiche e citochimiche ci hanno permesso di identificare con maggior precisione l'istotipo cellulare. Infatti: la positività diffusa alla Mieloperossidasi (MPO) e la negatività verso tutti i marker linfoidi, le citocheratine e la restante parte dell'algorithm anticorpale indirizzato alle linee cellulari midollari, ci ha permesso di restringere il campo individuando l'origine granulocitaria della lesione. La focale positività alla colorazione citochimica con Naphtol-ASD-chloracetate ha confermato quella all'MPO consentendoci di emettere la diagnosi finale di Sarcoma Granulocitico Neutrofilico di tipo immaturo con progressione verso la forma matura.

BIBLIOGRAFIA

1. Perkins S.E. [...] et al. (1996). Eosinophil granulocytic sarcoma in a New Zealand white rabbit. *Vet Pathol* 33: 89-91
2. Garcia A.P. [...] et al. (1998). Granulocytic Sarcoma in a Budgerigar (*Melopsittacus undulatus*). www.vet.uga.edu/ivcvm/1998/garcia/garcia.htm (2004)
3. Mayr B., [...] et al (1999) Cytogenetic, ras, and p53: studies in cases of canine neoplasms (hemangiopericytoma, mastocytoma, histiocytoma, chloroma). *The Journal of Heredity* 1999: 90
4. Paydaş S. [...] et al. (2000). Granulocytic Sarcoma as the cause of giant abdominal mass: diagnosis by fine needle aspiration and review of the literature. *Leukemia research* 24: 267-269
5. Corpechot C. [...] et al (2000). Granulocytic sarcoma of the jejunum: a rare cause of small bowel obstruction. *Brief case report* 93: 2586-2588
6. Chan J.K.C. (2000). Tumors of the lymphoreticular system, including spleen and thymus. *Diagnostic Histopathology of tumors*. II ed. Vol. 2. 21: 1204-1205
7. Schwarz J. [...] et al (2001). Aleukemic granulocytic sarcoma with AML1/ETO fusion gene expression and clonal T cell populations. *Leukemia Research* 25: 1137-1142
8. Marcato P.S. (2002). *Patologia Sistematica Veterinaria. Neoplasie dei tessuti immunoemopoietici*. 2.6.2 Neoplasie mieloidi.
9. Tóth E. [...] et al (2002). Complex pathological diagnosis of granulocytic sarcoma. *Apropos of a Case. Pathol. Res. Pract.* 198: 55-57
10. Amin K.S., [...] et al (2002). Minimally differentiated acute myelogenous leukemia (AML-M0) granulocytic sarcoma presenting in the oral cavity. *Oral Oncology* 38: 516-519
11. Valli V.E. [...] et al (2002). *Histological classification of hematopoietic tumors of domestic animals. WHO second series volume VIII*
12. Chan S.W.W., [...] et al (2003). Intracranial chloroma in hypereosinophilic myelofibrosis. *Surg. Neurol.* 59: 55-57

Anticorpo	Specificità	Pre T.	Diluizione
LCA	Antigene comune dei leucociti	MW	1:100
CD3	Cellule T	MW	1:50
CD45Ro	Cellule T della memoria	MW	1:300
CD30	Cellule T attivate, Linfoma anaplastico a grandi cellule	MW	1:150
CD79a	Cellule B	MW	1:50
CD20	Cellule B	MW	1:500

Tabella 1) Algorithm anticorpale rivolto verso le cellule di origine linfoide

Anticorpo	Specificità	Pre T.	Diluizione
MPO	Mieloblasti, Granulociti neutrofilii	MW	1:500
CD68 (KP1)	Linea istiocito-monocitica	Proteasi	1:100
CD34	Precursori ematopoietici	MW	1:50
CD117	Mastociti		1:50
CD15	Granulociti circolanti e tissutali	MW	1:100
Fatt. VIII	Megacariociti	Proteasi	1:600
Elastasi	Monociti		1:100
Glicoforina	Eritrociti e precursori eritroidi		1:200

Tabella 2) Algorithm anticorpale rivolto verso le cellule di origine mieloide

Anticorpo	Specificità	Pre T.	Diluizione
PAN-CK	Proteine del citoscheletro	MW	1:300

Tabella 3) Algoritmo anticorpale rivolto verso le cellule di origine epiteliale

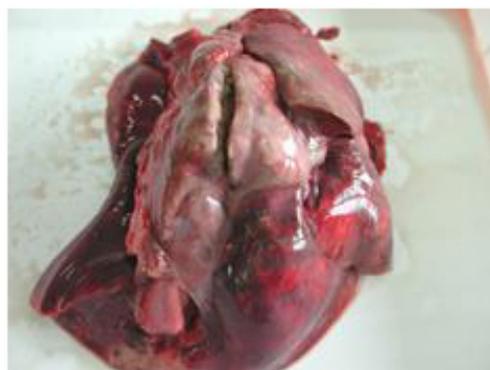


Foto 1) Voluminosa massa tumorale localizzata in ambito mediastinico, di colore grigiastro, superficie irregolare ed infiltrante i tessuti circostanti, di cui risulta essere una diretta continuazione.



Foto 2) Alla superficie di taglio si può osservare un aspetto lobulato, un colore bianco grigiastro e numerose aree necrotiche ed emorragiche.



Foto 3) Nel contesto del parenchima polmonare sono evidenti numerose altre neoformazioni del medesimo aspetto, in forma di mancootti peribronchiali in parte confluenti fra loro.

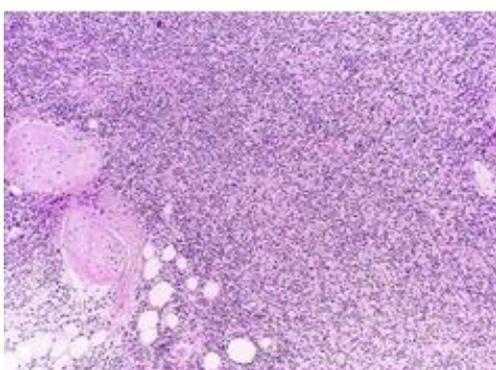


Foto 4) Lesione scarsamente circoscritta, fortemente infiltrante, a carattere nodulare, separati da fibre collagene. E.E. 4x

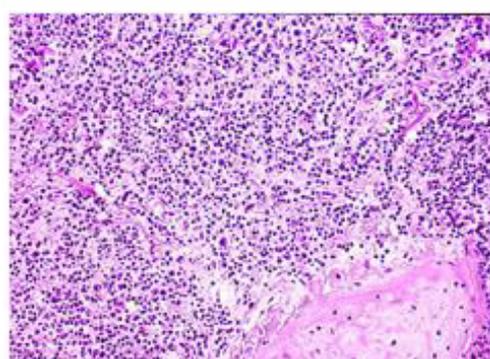


Foto 5) Particolare a maggior ingrandimento della foto precedente dove è ancora evidente la cartilagine bronchiale. E.E. 10x

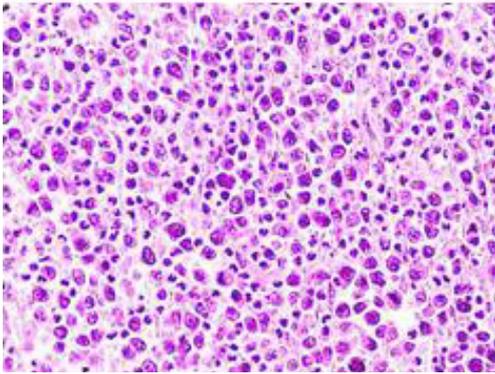


Foto 6) La popolazione è rappresentata da una popolazione di granulociti con vario grado di maturazione, fra i quali sono evidenti cellule di aspetto pleomorfo, di grandi dimensioni, con nucleo da rotondeggiante a lobulato, tre e più nucleoli e citoplasma eosinofilo. E.E. 40x

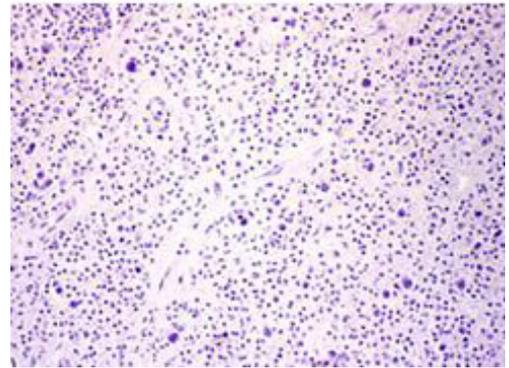


Foto 7) LCA negativo. 10x

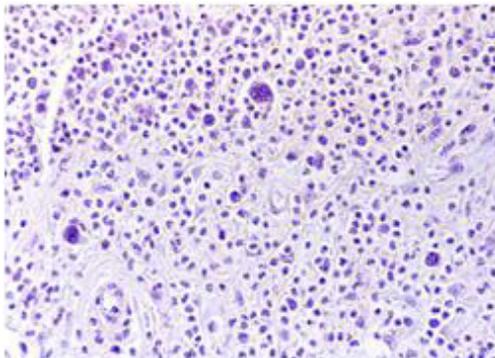


Foto 8) CD79a negativo. 20x

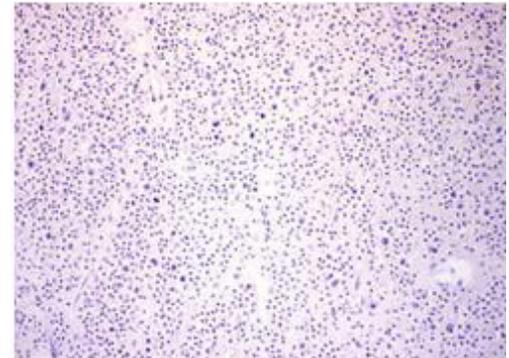


Foto 9) CD3 negativo. 10x

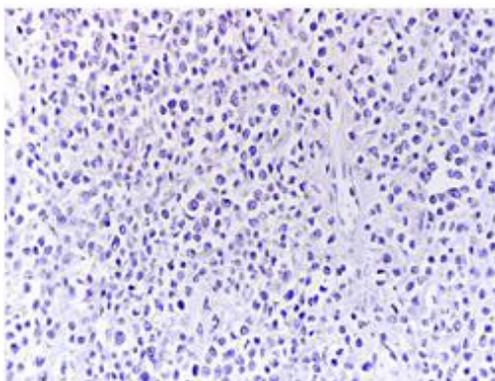


Foto 10) CD34 negativo 20x

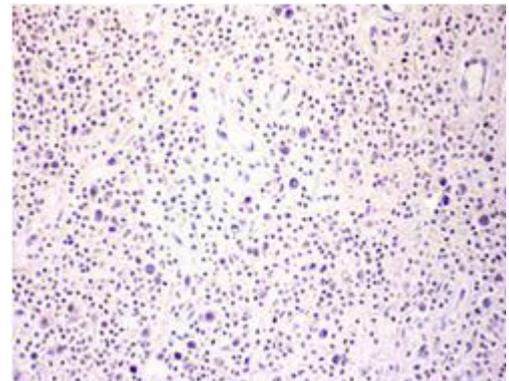


Foto 11) CD68 negativo 10x

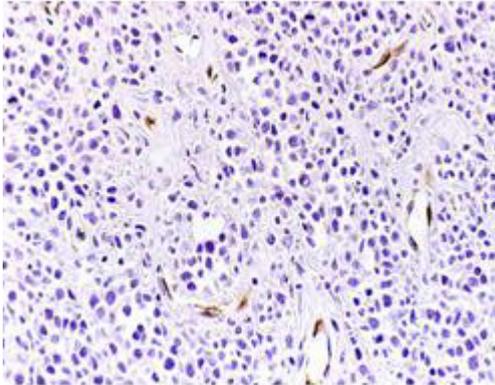


Foto 12) Fattore VIII. Si può osservare la positività espressa soltanto dalle cellule dell'endotelio vasale. 20x

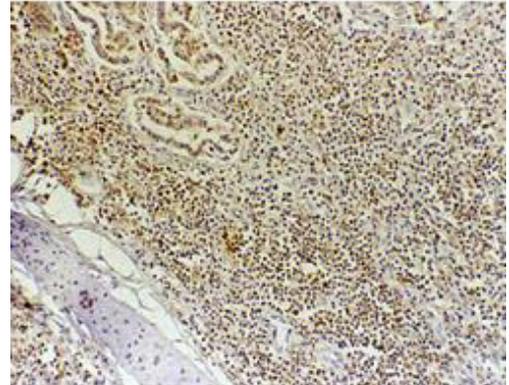


Foto 13) Forte positività alla mielperossidasi, specifica per mieloblasti e granulociti neutrofilici. 10x

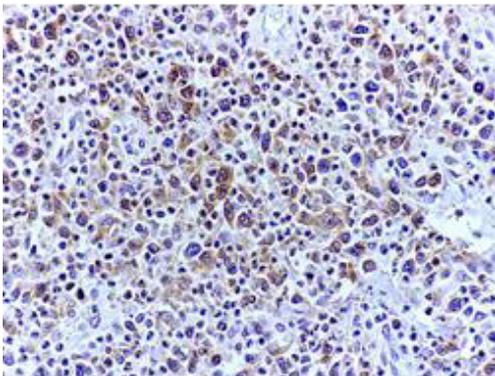


Foto 14) Particolare della precedente dove si può osservare la positività citoplasmatica della quasi totalità delle cellule. 40x

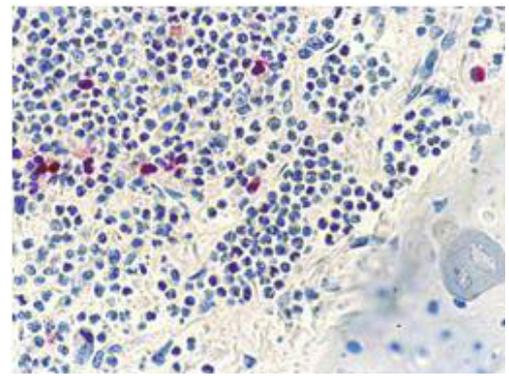


Foto 15) Positività focale alla colorazione con Naphtol-ASD-Chloracetate, che conferma ulteriormente la differenziazione neutrofilica della lesione. 20x

RISCONTRI ISTOLOGICI E IMMUNOISTOCHEMICI IN CUCCIOLI VACCINATI CONTRO IL PARVOVIRUS CANINO

Bollo Enrico, Valenza Federico, Buracco Paolo, Cannizzo Francesca Tiziana, Colombatti Vittorina

Università di Torino, Dipartimento di Patologia Animale, Via L. da Vinci, 44 – 10095 Grugliasco (TO)

Il parvovirus canino è responsabile di forme di enterite e miocardite, ad elevata incidenza di morbilità e mortalità. L'immunizzazione mediante vaccini attenuati ha consentito di ottenere un controllo efficace della malattia nella popolazione canina, nonostante periodici episodi di riemersione dell'infezione conseguenti a comparsa di varianti del virus.

Scopo del presente lavoro è stato di valutare l'efficacia di un nuovo vaccino contro il parvovirus canino, attraverso l'esame dei riscontri istologici e dei fenomeni di apoptosi a livello timico, delle colorazioni immunistochemiche per le cellule B e T, e della conta leucocitaria.

Sono stati vaccinati cinque cani di razza Beagle dell'età di 40 giorni con un vaccino vivo attenuato contro il parvovirus canino, somministrato per via intramuscolare (3 soggetti) ed endonasale (2 soggetti). Cinque soggetti della stessa razza ed età sono stati utilizzati come controlli. Ai giorni 14 e 21 post-vaccinazione sono state effettuate biopsie timiche per via chirurgica, sottoposte a colorazione istologica con H&E e a colorazione immunistochemica per apoptosi (mediante metodo TUNEL) e per i marker CD79 (cellule B) e CD3 (cellule T). Le conte leucocitarie sono state eseguite ai giorni -4, -1, 0, 3, 7, 10 e 14 post-vaccinazione.

Si è rilevata deplezione linfocitaria a livello timico e riduzione dei fenomeni di apoptosi in tutti i soggetti trattati (eccetto uno), rispetto ai controlli. Nei soggetti vaccinati si è inoltre rilevata la presenza di focolai di maggior espressione di positività per le cellule B (rispetto a una distribuzione più diffusa nei controlli) e incremento della positività per le cellule T. Le conte leucocitarie hanno rivelato un incremento ai giorni 3 e 7 post-vaccinazione, seguito da un ritorno ai valori normali.

Parole chiave: cane, parvovirus, vaccino, timo.

HISTOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL CHANGES OF THE THYMUS IN PUPPIES IMMUNIZED AGAINST CANINE PARVOVIRUS.

Canine Parvovirus is responsible for severe enteritis and myocarditis, often leading to death of puppies. Success against severe CPV infection in dogs has been obtained through immunization with attenuated vaccines, although a decrease in their efficiency has been observed in the last years.

Aim of this study was to assess the efficacy of a new vaccine against canine parvovirus, by evaluating the histology of the thymus, apoptotic phenomena, markers for B and T cells, and leukocyte counts.

Five beagle dogs aged 40 days were immunized with a live attenuated canine parvovirus vaccine, administered by intramuscular (3 animals) and endonasal (2 animals) route. Five beagle dogs were used as controls. Thymic biopsies were collected after 14 and 21 days and submitted to histological evaluation following H&E staining, detection of apoptosis by the TUNEL method, and B and T cells distribution following immunohistochemical staining with markers for CD79a and CD3 respectively. Leukocyte counts were performed -4, -1, 0, 3, 7, 10 and 14 days post-treatment.

The histological evaluation of the thymus sampled from dogs immunized with the canine parvovirus vaccine showed a depletion of lymphocytes and a reduced expression of apoptotic phenomena in all but one vaccinated animals, compared to controls. Vaccinated animals showed scattered foci of increased expression of B cells, compared to a more diffuse distribution in control animals, while mature T cells showed a relative increase in vaccinated dogs. Leukocyte counts revealed an increase at days 3 and 7 post-treatment, followed by a return to normal values.

Key words: dog, parvovirus, vaccine, thymus.

LA LEISHMANIOSI CUTANEA NEI CANI INFETTI NATURALMENTE È ASSOCIATA CON UNA RISPOSTA IMMUNE MEDIATA DA LINFOCITI T-HELPER 2

Brachelente Chiara *, Sforza Monica *, Mechelli Luca *, Müller Norbert §, Doherr Marcus †, Sattler Ursula ‡, Welle Monika ‡

* Dipartimento di Scienze Biopatologiche ed Igiene delle Produzioni Animali e Alimentari, Perugia

§ Istituto di Parassitologia, Facoltà Vetsuisse, Università di Berna

† Dipartimento di Medicina Clinica Veterinaria, Facoltà Vetsuisse, Università di Berna

‡ Istituto di Patologia Animale, Facoltà Vetsuisse, Università di Berna

La comparsa di lesioni cutanee è una manifestazione frequente dell'infezione da *Leishmania infantum* nel bacino del Mediterraneo. Scopo della ricerca è stato quello di indagare, attraverso l'utilizzo della tecnica della real-time reverse transcriptase-PCR, la risposta immune locale nelle biopsie cutanee provenienti da cani infetti con *Leishmania* (n.10), determinando il livello di citochine prodotte. Il controllo era rappresentato da biopsie cutanee provenienti da cani sani (n.10) e con allergia alle pulci (n. 10). È stata inoltre determinata la carica parassitaria nei campioni biotici al fine di determinare una correlazione tra questa, il quadro istopatologico e la produzione di citochine T helper-1 (TH1)/T helper-2(TH2) nella cute di cani naturalmente infetti. Nei cani infetti con *Leishmania*, la produzione dell'mRNA per IL-4, TNF- α e IFN- γ è risultata statisticamente più elevata rispetto a quella dei cani del gruppo di controllo. Inoltre, nei cani con alta carica parassitaria è stato possibile evidenziare una maggiore produzione di IL-4, mentre non si notavano differenze statisticamente significative per le altre citochine. Dal confronto tra il modello istologico di infiammazione e l'espressione delle citochine, è emersa un chiara tendenza e cioè che i livelli di IL-4, TNF- α , e IFN- γ erano più elevati nelle biopsie in cui l'infiltrato cellulare mostrava un orientamento periannessiale ed in quelle in cui la gravità dell'infiltrato periannessiale era pari all'infiltrato perivascolare-interstiziale. I risultati dello studio dimostrano che la risposta immune locale in cani naturalmente infetti con *Leishmania* è caratterizzata dalla presenza di sottopopolazioni di linfociti T helper, sia Th1 che Th2. Inoltre, i dati ottenuti suggeriscono che l'aumentata espressione di IL-4 possa essere associata sia con la gravità della sintomatologia clinica che con un'alta carica parassitaria nelle lesioni cutanee.

Parole chiave: cane; citochine; leishmaniosi; PCR quantitativa; cute.

CUTANEOUS LEISHMANIASIS IN NATURALLY INFECTED DOGS IS ASSOCIATED WITH A T HELPER-2-BIASED IMMUNE RESPONSE.

Skin lesions are a frequent manifestation of *Leishmania infantum* infections in Mediterranean countries. The objective of this study was to elucidate whether a correlation exists between parasite number, histologic response, and T helper-1 (TH1)/T helper-2 (TH2) cytokine expression in lesional skin of naturally *Leishmania*-infected dogs by real-time RT-PCR. In *Leishmania*-infected dogs, IL-4, TNF- α and IFN- γ , m-RNA production was significantly higher than controls. Furthermore, dogs with a high *Leishmania* burden had a significantly higher IL-4 expression, whereas no difference was noted with regard to expression of other cytokines. Comparing the pattern of inflammation and cytokine expression, the levels of IL-4, TNF- α , and IFN- γ were elevated in biopsies with a periadnexal nodular pattern and in biopsies where the severity of the periadnexal infiltrate was equal to the perivasculare to interstitial infiltrate. Expression of IL-4, IL-13, and TNF- α was slightly increased in biopsies where plasma cells prevailed on lymphocytes, whereas expression of IFN- γ was moderately higher when lymphocytes were predominating. The present study demonstrates that the local immune response in naturally occurring leishmaniasis includes TH1 as well as TH2 cytokine subsets. Furthermore, respective data suggest that increased expression of the TH2-type cytokine IL-4 is associated with both severe clinical signs and a high parasite burden in the skin lesions.

Key words: canine; cytokines; leishmaniasis; quantitative PCR; skin.

**IMPIANTO DI CELLULE MIOCITICHE AUTOLOGHE NELLA TERAPIA DELL'INSUFFICIENZA
MITRALICA ISCHEMICA: STUDIO ISTOLOGICO, IMMUNOENZIMATICO ED IMMUNOISTOCHEMICO**

Cantoni Anna Maria⁽¹⁾, Ferrari Maura⁽²⁾, Passeri Bendetta⁽¹⁾, Lazzaretti Mirca⁽¹⁾, Di Lecce Rosanna⁽¹⁾, Cristina Ribera⁽¹⁾, Cabassi Enrico⁽¹⁾, Corradi Attilio⁽¹⁾

⁽¹⁾Dipartimento di Salute Animale, Università degli Studi di Parma; ⁽²⁾Centro Substrati Cellulari, IZSLER, Sez. Brescia

Obiettivi: 1) allestimento delle colture miocitiche autologhe; 2) impianto chirurgico, dopo 45 giorni, di miociti BrdU marcati nelle aree infartuate; 3) dosaggio con metodo immunoenzimatico del livello sierico di Troponina I (cTnI), ad intervalli regolari, in 8 pecore, prima e dopo il danno ischemico e l'inoculo dei miociti; 4) valutazione istologica ed immunohistochemica (Desmina, Actina sarcomerica, Troponina, Actina muscolo liscio, Vimentina, VW, CD34, CD31, BrdU).

Nello studio sono state impiegate 16 pecore di 24 mesi suddivise in due gruppi omogenei: A) animali sottoposti ad infarto miocardico acuto iatrogeno, alla base d'impianto dei muscoli papillari, e successivo inoculo di miociti; B) animali di controllo sottoposto ad induzione ischemica e inoculo di medium di coltura.

I livelli sierici di cTnI sono risultati in aumento dopo il I giorno dall'ischemia e dall'inoculo di miociti per rientrare gradualmente nei livelli fisiologici nei giorni successivi. Negli animali con necrosi ischemiche più estese si sono osservati processi di neo-angiogenesi nelle aree perinfartuali associati alla presenza di corpi vescicolosi BrdU immunopositivi nel citoplasma di macrofagi.

I risultati indicano che l'anticorpo anti-cTnI del commercio utilizzato per la specie umana presenta cross-reattività anche per il polipeptide ovino e pertanto è un sicuro ed efficace indicatore di danno ischemico miocardico acuto anche in questa specie. La sopravvivenza dei miociti inoculati è probabilmente molto limitata od addirittura assente.

Da quanto osservato, si può ipotizzare la necessità di impiegare, nei progetti sperimentali futuri, mioblasti o cellule staminali in grado di differenziarsi ed adattarsi meglio alle necessità del contesto della sede d'impianto.

Parole chiave: pecora, ischemia miocardica, miociti autologhi, IHC, cTnI.

**THERAPEUTIC AUTOLOGOUS MYOCYtic IMPLANTATION IN MITRALIC ISCHEMIC INSUFFICIENCY:
HISTOLOGICAL, IMMUNOENZYMATIC AND IMMUNOHISTOCHEMISTRY INVESTIGATIONS.**

Aim of the study: 1) culture of autologous myocytes; 2) BrdU marked myocytes implantation into infarct area 45 days after induced ischemia 3) chemiluminescent immunodosage of seric Cardiac Troponin I (cTnI) before and after the induced ischemia and myocytes implantation 4) histology and immunohistochemistry (Desmin, Sarcomeric Actin, Troponin I, smooth muscle Actin, Vimentin, VW, CD34; CD31; BrdU).

For this study, chronic myocardial ischemia was produced in 16 adult sheep, aged 24 months, by coronary artery ligation. 8 subjects had autologous myocytes implantation to the infarct area (group A); 8 subjects had culture medium injection to the infarct area (control group B). Both the groups were blood sampled regularly for cTnI immunoassay.

cTnI levels increased after at least one day after surgery or myocytes implantation and gradually recovered to physiological levels in the next days.

Neo-angiogenesis at the edge of the ischemic areas and immunopositive bodies in macrophage cytoplasm around the injection site were observed.

Commercial cTnI antibody completely cross-reacts with sheep polypeptide. cTnI is a valid myocardial ischemia indicator in sheep. It is possible that myocytes have a very short or none viability when inoculated.

In conclusion, after these observations, it would be interesting to investigate in the future on the possibility to use adaptable myoblasts or stem cells in different implantation sites.

Key word: sheep, myocardic ischaemia, autologous myocyte, IHC, cTnI.

DISPLASIA RENALE NEL CANE: DESCRIZIONE DI DUE CASI

Vezzali Enrico, Sarli Giuseppe

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

Due cani maschi di 6 mesi, uno Schnautzer nano ed un Pastore Tedesco, che riportavano in anamnesi insufficienza renale clinicamente documentata, sono afferiti al nostro servizio. Nel primo caso sono pervenuti unicamente entrambi i reni per un esame istopatologico, mentre nel secondo è stata effettuata un'autopsia completa che ha evidenziato alterazioni a carico del cuore, con iperemia endocardica valvolare atrio-ventricolare destra, e del tratto digerente, la cui mucosa con erosioni di 0,5cm in diametro era fortemente odorante d'ammoniaca anche dopo lavaggio, nonché dei reni; questi ultimi, di dimensioni ridotte e colore grigiastro chiaro, dopo difficoltoso scapsulamento presentavano superficie esterna grinza e finemente bozzellata; in sezione si apprezzava ipoplasia, soprattutto corticale. In entrambi i soggetti l'esame istopatologico dei reni mostrava un quadro indicativo di displasia renale, contraddistinta da glomeruli fetali con fenomeni di atrofia cistica (dilatazione dello spazio subcapsulare, evoluta fino all'atrofia ed alla sclerosi del gomitollo capillare) e proliferazioni displastiche dell'epitelio tubulare (di tipo pseudostratificato adenomatoide); le lesioni erano associate a grave fibrosi interstiziale cortico-midollare disposta radialmente e a fenomeni di microlitiasi; limitatamente allo Schnautzer nano, si osservavano calcificazioni a carico delle membrane basali, sia periglomerulari che tubulari.

La displasia renale è una malattia nota in diverse specie animali e una forma eredo-familiare si riscontra nel cane, solitamente entro i primi 8 mesi di vita, colpendo soprattutto soggetti maschi. Si manifesta con sindrome uremica, anemia riferibile a diminuita sintesi d'eritropoietina e ipercalcemia riconducibile a rimaneggiamento osseo, disidratazione o iperparatiroidismo secondario. Lo sviluppo disorganizzato del parenchima renale, ascrivibile ad una differenziazione anomala delle zone nefrogeniche fetali, ha tutt'ora eziologia incerta.

Tutti i principali reperti clinici e patologici che contraddistinguono questa nefropatia sono presenti nei casi descritti, ad eccezione della metaplasia disontogenica cartilaginea, da alcuni autori considerata discriminante.

Parole chiave: Rene; displasia; malattie eredo-familiari.

CANINE RENAL DYSPLASIA: REPORT OF TWO CASES.

Object of the present report are two 6 month-old male dogs, a miniature Schnautzer and a German Shepard, with clinically evaluated renal failure. In the first case both kidneys were the only organs presented for histopathological examination, whereas a complete necropsy was performed in the second. The findings shown were those of cardiac, gastro-intestinal and renal lesions. The kidneys, reduced in dimension and pale grey in colour, after difficult removal of their capsules, showed finely wrinkled and bumped external surface; the cut section showed cortical hypoplasia. In both cases, histopathologic examination of both kidneys was indicative of renal dysplasia, consisting in fetal glomeruli with cystic atrophy and dysplastic proliferation of the tubular epithelium; these were often associated with massive cortical and medullary fibrosis and microlythiasis; in one case (miniature Schnautzer) also basal membranes calcifications were present.

Renal dysplasia is observed in several animal species, and a familial form is described in dogs younger than 8 months of age, mostly male, suffering from uremic, anemic and hypercalcemic syndromes. The disorganized development of renal parenchyma, referred to anomalous differentiation of phoetal nephrogenic zones, has uncertain origin.

The main clinical and pathological findings distinctive of this nephropathy are present in cases described in the present report, except for disonthogenic cartilagineous dysplasia, considered typical by some authors.

Key words: Kidney; dysplasia; familial diseases.

INTRODUZIONE

La displasia renale è una malattia familiare ereditaria che può colpire diverse specie fra cui l'uomo, specie nella quale si manifestano diverse forme caratterizzate invariabilmente da presenza di cisti renali, rientrando nel complesso di patologie denominato "rene policistico", le cui anomalie geniche che ne sono alla base sono ben note: si conoscono alterazioni geniche dominanti nell'adulto e recessive nel bambino (Cotran et al., 1999). Nel cane questa patologia rientra fra le patologie ereditarie ma non sono stati chiaramente delineati i geni coinvolti, ammettendo anche le

Associazione Italiana di Patologia Veterinaria

alterazioni durante la gestazione come possibile concausa della malattia, che quindi potrebbe rientrare fra le patologie acquisite (Cotran et al., 1999). La displasia renale canina si nota solitamente nei soggetti maschi entro gli 8 mesi di vita, manifestandosi con sindrome uremica, anemia da diminuita sintesi d'eritropoietina ed ipercalcemia da rimaneggiamento osseo, disidratazione (Autran de Morais et al., 1996), iperparatiroidismo considerato secondario (Daniel et al., 1995) o da eccesso di proteina correlata al paratormone (parathyroid hormon related protein, PTH-rP), determinante nell'omeostasi del calcio durante la vita fetale e i primi mesi dopo la nascita (Maxie, 1993).

L'eziologia, che come anticipato è tutt'ora incerta, e la patogenesi chiamano in causa la differenziazione anomala delle zone nefrogeniche fetali che portano ad uno sviluppo anomalo, incompleto e disorganizzato del parenchima renale. La presenza di cisti renali che contraddistinguono la patologia nell'uomo (Cotran et al., 1999) non è determinante nel cane e si può considerare semplicemente un rilievo frequente (Maxie, 1993).

Nella descrizione di due casi si sottolineano i tratti distintivi della displasia renale eredo-familiare del cane: la persistenza dei dotti metanefrinici in un contesto di atrofia cistica glomerulare viene considerata discriminante dalla maggior parte degli autori; secondo altri sarebbe invece patognomica la presenza di metaplasia cartilaginea disontogenica, assente nei casi descritti.

MATERIALI E METODI

Presso il Servizio di Anatomia Patologica del Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Bologna sono stati riferiti due casi, il primo dal Dipartimento Clinico Veterinario ed il secondo da un veterinario libero professionista, per approfondimento diagnostico.

Il primo caso riguarda un cane Schnautzer nano maschio di 6 mesi, che riportava in anamnesi sindrome poliuria-polidipsia da 3 mesi, disoressia e dimagrimento da 15 giorni ed una grave stomatite, probabilmente originata dall'alveo dentale e non correlata ad iperazotemia. L'esame delle urine aveva messo in luce proteinuria caratterizzata in un secondo tempo mediante elettroforesi SDS-PAGE, che ha rilevato la presenza di proteine di origine glomerulare. L'ecografia renale aveva mostrato diminuzione di dimensioni e corticale assottigliata con profilo irregolare, nonché la presenza di una macrocisti in posizione iuxta-midollare. Dopo l'eutanasia dell'animale sono afferiti presso il nostro servizio unicamente i reni.

Il secondo caso riguarda un cane Pastore Tedesco maschio di 6 mesi che riportava in anamnesi inappetenza, vomito, dimagrimento, alitosi uremica, diarrea con colore brunastro delle feci, erosioni linguali ed ottundimento del sensorio, sintomatologia coerente con insufficienza renale, dimostrata mediante rilievi ematobiochimici suggestivi di anemia (ematocrito=15.1%, eritrociti=2,23milioni/ μ l, emoglobina=5,9 gr/dl) ed alterazioni renali (fosfatasi alcalina=214 U/l, urea=214 U/l e creatinina=11.67 U/l); su base ecografica è stata riscontrata iperecogenicità ed irregolarità di superficie di entrambi i reni, con diminuzione di dimensione soprattutto del destro, di forma globosa e diametro di 4,6cm. Dopo eutanasia mediante iniezione endovenosa (Pentothal®, Intervet, 10ml seguito da Tanax®, Intervet, 10ml in infusione lenta) è stata eseguita l'autopsia.

I reni di entrambi i soggetti, nonché il cuore e l'intestino del caso #2, sono stati fissati in formalina di Carson; le sezioni di tessuto sono state colorate con Ematossilina-Eosina (EE) e, limitatamente a quelle renali, con le colorazioni speciali Tricromica di Masson (TM, per l'evidenziazione del tessuto connettivo maturo) e Periodic Acid Schiff's (PAS, per le glicoproteine); è stato effettuato anche un pannello completo di colorazioni istochimiche per il calcio: Alizarina S (AS, che a pH=7 colora carbonati, fosfati ed ossalati ma che al pH nominale=4.2 colora unicamente carbonati e fosfati), Von Kossa (VK, la cui affinità per gli ossalati è dubbia), ed Yasue, ossia il metodo nitrato d'argento-acido rubeanico (Y, appositamente indicato per gli ossalati).

RISULTATI

Durante la necropsia del soggetto #2 sono emerse alterazioni a carico del cuore, che presentava iperemia a carico della valvola atrio-ventricolare destra, del tratto digerente, fortemente odorante d'ammoniaca anche dopo lavaggio, con erosioni mucosali buccali, linguali, esofagee e soprattutto gastriche, fino ad un diametro di 0.5cm, nonché renali: entrambi i reni erano di dimensioni ridotte e colore grigiastro chiaro; il difficoltoso scapsulamento esponeva la superficie esterna grinza e finemente bozzellata; dopo sezione si apprezzava ipoplasia, soprattutto corticale.

L'esame istopatologico dei reni mostrava in entrambi i casi, sulle sezioni colorate con EE, un quadro caratteristico della displasia renale, contraddistinta da glomerulonefrosi con atrofia cistica glomerulare (dilatazione dello spazio subcapsulare, evoluta fino all'atrofia ed alla sclerosi del gomito capillare) che contraddistinguono i glomeruli fetali, affiancati da glomeruli maturi pressochè normali o con moderata proliferazione mesangiale, in un quadro di differenziazione asincrona; la proliferazione mesangiale è stata evidenziata meglio dalla colorazioni PAS e TM, quest'ultima più indicata per le lesioni cronicizzate. Sempre su sezioni colorate con EE si osservavano anche dotti metanefrinici persistenti, caratterizzati da proliferazioni displastiche dell'epitelio tubulare, di tipo pseudostratificato adenomatoide. Associate a questi fenomeni, è anche stata osservata una massiva fibrosi progressiva, radiale, cortico-

midollare, messa in risalto dalla colorazione TM. Le calcificazioni delle membrane basali, sia periglomerulari sia tubulari, del caso #1 e la microlitiasi presente nel caso #2 sono state caratterizzate dalle colorazioni per i diversi sali di calcio, identificando nel primo caso ossalati (VK e Y positivi), presumibilmente associati ad alterazioni dell'omeostasi del calcio, mentre nel secondo caso sono stati evidenziati fosfati e carbonati (AS e VK positivi ma Y negativi), composti spesso associati a calcificazione distrofica.

DISCUSSIONE

Il caso #1 suggerisce che l'adozione della metodica SDS-PAGE, comprovante l'origine, si è rivelata decisiva nel stabilire l'origine glomerulare della proteinuria e quindi la sede del deficit funzionale renale, potendo avvalorare l'ipotesi di displasia renale.

La diagnosi certa di displasia renale è possibile unicamente mediante l'esame istopatologico, in cui le cui alterazioni distintive sono peraltro ancora discusse: oltre ai rilievi da noi riportati, si possono osservare anche altre lesioni descritte da altri autori ma non riscontrate nei nostri casi; tali alterazioni, come la persistenza del mesenchima (connettivo immaturo), la metaplasia disontogenica cartilaginea e ossea dello stesso e la lipidosi glomerulare, sono considerate discriminanti da una minoranza della comunità scientifica (Kerlin e Van Winkle, 1995).

La dilatazione cistica dello spazio di Bowman viene giustificata da un aumento pressorio a livello tubulare causato dalla presenza di connettivo peritubulare che si contrae in seguito a maturazione (Picut e Lewis, 1987).

Nel caso #1, le calcificazioni delle membrane basali periglomerulari e tubulari sono correlabili ad ipercalcemia e non a calcificazione distrofica, che solitamente porta a microlitiasi intratubulare. L'ipercalcemia si riscontra frequentemente nei cani colpiti da displasia renale: secondo alcuni autori sarebbe semplicemente da ricondurre al normale rimaneggiamento osseo giovanile o, tutt'al più, alla disidratazione correlabile a problemi renali (Autran de Morais et al., 1996), mentre secondo altri sarebbe da collegare ad iperparatiroidismo secondario al danno renale calcio-disperdente (Daniel et al., 1995).

Nel caso #2, la patologia è apparsa improvvisamente all'età di 6 mesi ed è stata caratterizzata da evoluzione clinica molto rapida: il sospetto di displasia renale deve essere considerato anche in soggetti che per alcuni mesi di vita non mostrano deficit a carico dell'emuntorio renale.

CONCLUSIONE

L'insufficienza renale nel cane giovane riconosce la displasia renale eredo-familiare come rara ma possibile causa da non sottovalutare durante l'approccio clinico.

BIBLIOGRAFIA

Autran de Morais, H. S., Di Bartola, S. P., and Chew, D. J.: Juvenile renal disease in Golden Retrievers: 12 cases (1984-1994). *J Am Vet Med Ass* (1996), 209 (4): 792-797.

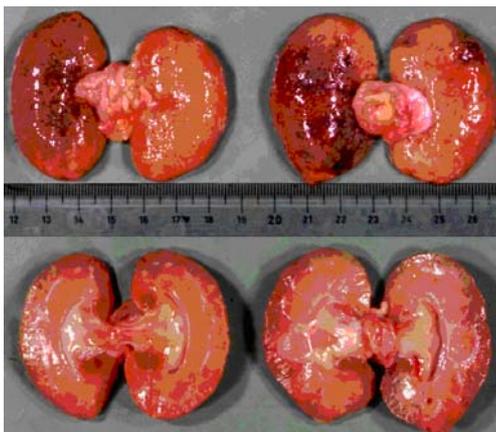
Daniel T, Carmichael D, Williams CA, and Aller S: Renal dysplasia with hyperparathyroidism and loose teeth in a young dog. *J Vet Dent* (1995), 12 (4): 143-146.

Cotran, R. S., Kumar, V., and Collins, T., (eds.): *Robbins Pathologic basis of disease*, 1999, 6th edn., W. B. Saunders, Philadelphia, Pennsylvania.

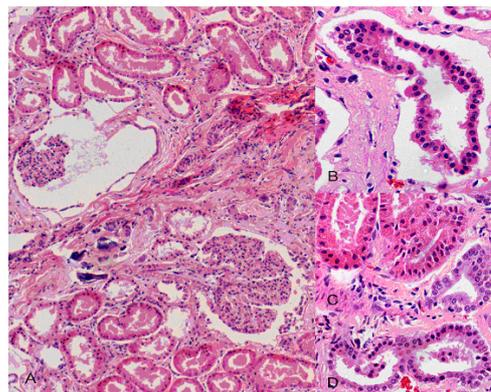
Kerlin, R. L., and Van Winkle, T. J.: Renal dysplasia in Golden Retrievers. *Vet Pathol* (1995), 32 (3): 327-329.

Maxie, M. G.: The urinary system. In: Jubb, K. V. F., Kennedy, P. C., and Palmer, N. (eds.): *Pathology of domestic animals*, 1993, 4th edn., Vol.2. Academic Press, San Diego, California.

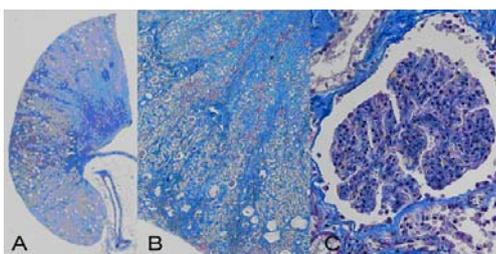
Picut, C. A., and Lewis, R. M.: Microscopic features of canine renal dysplasia. *Vet Pathol* (1987), 24: 156-163.



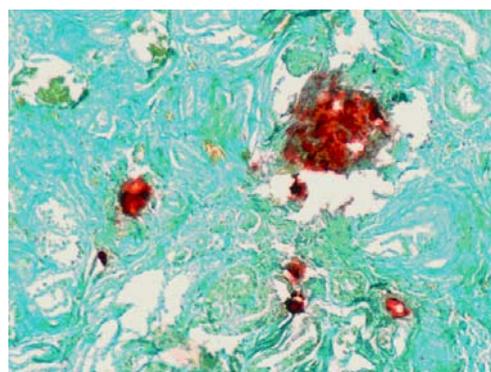
Aspetto macroscopico di reni displastici, superficie esterna ed interna in sezione. Caso #2.



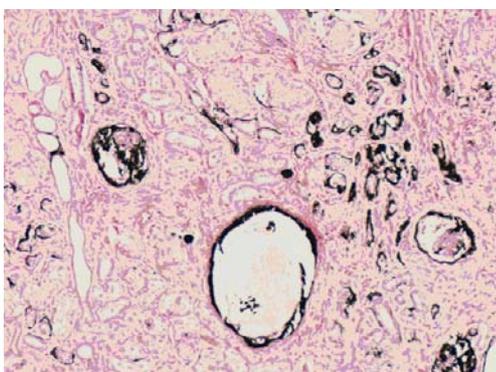
Differenziazione asincrona dei glomeruli, con alcuni glomeruli immaturi andati incontro ad atrofia cistica glomerulare affiancati da altri caratterizzati solo da una moderata proliferazione mesangiale (A) e persistenza di dotti metanefrinici (B, C e D). Composizione. Caso #2. Ematossilina-Eosina. 10x (A) e 40x (B, C e D).



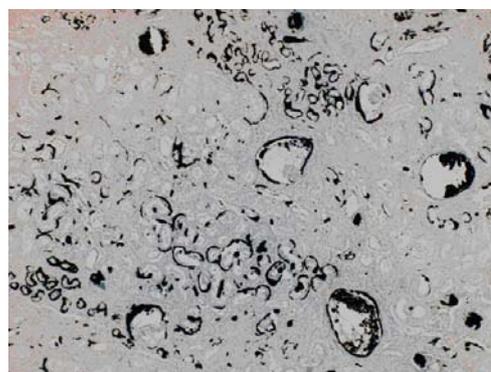
Fibrosi radiale cortico-midollare (A e B) ed ispessimento del mesangio (C). Composizione. Caso #2. Tricromica di Masson. Dimensioni reali (A), 5x (B) e 40x (C).



Microlitiasi riferibile a calcificazioni distrofiche intratubulari. Caso #2. Alizarina S. 10x.



Calcificazioni delle membrane basali periglomerulari e tubulari. Caso #1. Von Kossa. 10x.



Dimostrazione della natura del deposito: ossalato di calcio. Caso #1. Yasue. 5x.

DISTURBI DELL' OSSIFICAZIONE ENCONDRALE: UN CASO DI OSTECOCONDROSI CANINA

Leonardi Leonardo¹, Mechelli Luca¹, Pool R. Roy²

¹Università degli Studi di Perugia – Facoltà di Medicina Veterinaria – Dipartimento di Scienze Biopatologiche ed Igiene delle Produzioni Animali e Alimentari; Via San Costanzo, 4 – 06126 Perugia;

²Texas A&M University – College of Veterinary Medicine – Department of Pathobiology – Texas Veterinary Medical Center; College Station, Texas 77843-4467 – USA.

L'Osteocondrosi è una malattia che fu inizialmente considerata di importanza limitata ma che oggi rappresenta una delle più frequenti malattie articolari che colpisce specie animali diverse, compresa quella canina.

Le lesioni basilari di questa malattia risiedono in un disturbo dell'ossificazione encondrale che colpisce prevalentemente animali a rapida crescita.

Il termine è stato utilizzato per una varietà di disturbi cartilaginei in cui le lesioni iniziali mostravano danni focali macroscopicamente evidenziabili, localizzati all'interno di giunzioni osteocondrali, che si sviluppavano lungo le superfici articolari di ossa pari.

La malattia si manifesta con caratteristiche lesioni generalizzate anche se, in alcuni casi, solo alcune articolazioni risultano essere più colpite rispetto ad altre. L'Osteocondrosi è una delle cause più comuni di zoppia e di dolore nella specie canina. Si manifesta solitamente a carico della spalla, del gomito, del ginocchio e del tarso di cani immaturi di taglia gigante o grande.

L'esatta eziologia di questa malattia è ancora sconosciuta, ma la sua insorgenza primitiva viene considerata come la conseguenza dell'interazione di diversi fattori tra i quali emergono quelli legati ad errori di tipo nutrizionale e quelli relativi alla predisposizione genetica di cani giovani in fase di crescita. Tra i fattori di rischio più frequenti per l'Osteocondrosi vengono anche compresi l'età, il sesso, la razza, il rapido tasso di crescita dell'animale e l'eccessiva somministrazione di sostanze nutritive.

Scopo di questa comunicazione è quello di descrivere un caso di Osteocondrosi canina, diagnosticato presso la Texas A&M University, cercando di approfondire differenti caratteristiche di questa, relativamente frequente, quanto sottostimata, malattia articolare.

Parole chiave: Cane, disturbi dell'ossificazione; osteocondrosi.

DISTURBANCES OF ENDOCHONDRAL OSSIFICATION: ONE CASE OF CANINE OSTEOCHONDROSIS.

Osteochondrosis is a common developmental orthopedic disease of different species of animals enclosed the dog. The disease is caused by a disturbance in the process of endochondral ossification. The specific causes are still unknown but many factors are implicated in the pathogenesis of the disease. These are resumed in growth rate, genetics and nutrition.

Osteochondrosis typically affects the shoulder, elbow, stifle or hock joint, causing lameness, joint effusion and osteoarthritis. Clinical signs can develop in dogs as young as 4 month of age.

We describe a case of canine Osteochondrosis diagnosed at the Texas A&M University, with the purpose to deepen other characteristics of this frequent and underestimated degenerative joint disease.

Key words: Dog; disturbance of ossification; Osteochondrosis.

CARATTERIZZAZIONE ISTOLOGICA DELLE LESIONI DEGENERATIVE DEI DISCHI INTERVERTEBRALI DEL PASTORE TEDESCO ANZIANO: INDAGINE PRELIMINARE

Capucchio Maria Teresa, Antoniazzi Anna, Catalano Deborah, Amedeo Stefano, Mioletti Silvia, Sammartano Federica, Valenza Federico, Valazza Alberto.

Università di Torino, Dipartimento di Patologia Animale, Via L. da Vinci, 44 – 10095 Grugliasco (TO)

Le patologie del disco intervertebrale sono state ampiamente studiate nei cani appartenenti a razze condrodistrofiche ove assumono importanza clinica rilevante. Al contrario risulta meno indagato il processo patogenetico della degenerazione discale nelle razze non condrodistrofiche ove, la discopatia presenta caratteri sovrapponibili a quella riscontrata in medicina umana. La nostra ricerca ha avuto lo scopo di valutare le alterazioni istologiche degenerative dei dischi intervertebrali nei Pastori Tedeschi adulti, razza nella quale l'incidenza della patologia è superiore rispetto alle altre razze non condrodistrofiche. Sono stati pertanto raccolti i dischi intervertebrali toraco-lombari e i relativi midolli spinali di n° 14 cani (13 Pastori Tedeschi e un Pittbull quale controllo) di età compresa tra 6 e 13 anni. I midolli spinali sono stati fissati in formalina tamponata al 10% previa valutazione macroscopica in relazione a presenza/assenza di reperti quali in particolare pachimeningiti ossificanti. I dischi intervertebrali sono stati in parte processati per l'esame istologico in parte congelati a -20°C per successive indagini biochimiche volte alla valutazione dei componenti della matrice. I dischi da sottoporre ad esame istologico sono stati decalcificati in Osteodec, inclusi in paraffina e successivamente colorati con ematossilina-eosina o blu di toluidina. L'indagine ha permesso di rilevare numerose lesioni istologiche a carico dei dischi intervertebrali coinvolgenti le diverse componenti del disco (nucleo ed anello) e le adiacenti strutture legamentose (legamenti longitudinali, dorsale e ventrale). Il tratto di colonna prescelto per le indagini, rappresentato dalle vertebre della giunzione toraco-lombare, è risultato costantemente compromesso, con quadri variabili di gravità. Per confermare le lesioni osservate e chiarirne meglio i meccanismi patogenetici il gruppo di lavoro si propone di ampliare il numero dei campioni, il range di età e il tratto di colonna in esame. Saranno inoltre effettuate indagini biochimiche ed immunoistochimiche in particolare rivolte alla valutazione dei componenti della matrice dei dischi.

Parole chiave: disco intervertebrale, cane Pastore Tedesco, istologia, degenerazione.

HISTOLOGICAL CHARACTERIZATION OF DEGENERATIVE LESIONS OF INTERVERTEBRAL DISKS IN OLD GERMAN SHEPHERD DOGS: PRELIMINARY INVESTIGATIONS.

Intervertebral disks pathologies has been studied in the chondrodystrophoid canine breeds where degenerative changes are very important. On the contrary the pathological mechanism of the lesions in nonchondrodystrophoid breeds is not totally known. The present study reports the histological lesions observed in the intervertebral disks of 13 adults German Shepherd dogs, breed particularly affected by degenerative changes of disks. The spinal medulla were macroscopically evaluated and 10% formalin fixed. The disks were formalin fixed, decalcified and processed to obtain histological sections stained using ematoxilina and eosin. The researche permitted to observe numerous lesions involving the structural regions of the disk (nucleus, annulus), the cartilaginous end-plates and the longitudinal ligaments. The majority of the lesions were located in T11-L2.

To confirm the results of this study the authors would like to examine more specimens, dogs of different age and a larger trait of the column. Biochemical and immunohistochemical investigations will be performed to better evaluate the age-related changes in the extracellular matrix.

Key words: intervertebral disc, German Shepherd dog, histology, degeneration.

TELEPATOLOGIA NELLA DIAGNOSTICA CITOLOGICA VETERINARIA

Maiolino Paola, Restucci Brunella, Papparella Serenella, De Vico Gionata*

Dipartimento di Patologia e Sanità Animale – Settore di Anatomia Patologica - Facoltà di Medicina Veterinaria – Università degli Studi di Napoli Federico II.

**Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria, Sezione di Patologia Generale e Anatomia Patologica Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Messina.*

La telepatologia può essere definita come la trasmissione di immagini e dati relativi a preparati patologici con l'intento di fornire una diagnosi, un consulto o una conferma tra patologi dislocati in località diverse. Essa si avvale di un sistema di telecomunicazioni che permette di inviare e ricevere informazioni multimediali in tempo reale. Attualmente la forma di trasmissione più utilizzata è la posta elettronica (e-mail), in quanto risulta essere il mezzo di comunicazione più semplice ed economico. Tale metodologia di spedizione ricade usualmente nella categoria della telemedicina cosiddetta store-and-forward, in cui si ha dapprima la acquisizione e memorizzazione delle immagini, ed in seguito la loro spedizione. Per valutare l'utilità e la validità di tale metodo anche in medicina veterinaria, 20 casi citologici, per un totale di circa 1000 immagini furono inviate tramite e-mail dalla sezione di Anatomia Patologica della Facoltà di Medicina Veterinaria di Napoli alla sezione di Patologia della Facoltà di Medicina Veterinaria di Messina. Dopo aver ricevuto una risposta della lettura virtuale si passò all'invio dei preparati citologici ed istologici per una conferma. I risultati ottenuti indicano che c'è un buon accordo tra telecitodiagnosi e diagnosi convenzionale (70%) così come un'elevata concordanza diagnostica (90%) confermando l'utilità e la validità della telepatologia tramite posta elettronica nella diagnostica citologica.

Parole chiave: telepatologia, diagnostica citologica.

TELEPATHOLOGY DIAGNOSIS IN VETERINARY CYTOLOGY.

Telepathology is the process of diagnostic pathology at a distance through a suitable communication channel. Current applications include diagnosis in routine surgical pathology, second opinions, and subspecialty consultations. At present, diagnostic telepathology by electronic mail (e-mail) attachment is the most common communication medium, because it is relatively simple and incurs minimal cost. We assessed its accuracy and practical aspects in routine diagnostic cytopathology. Using 20 cytology cases, a total of 1000 images were digitized by one pathologist and sent as e-mail attachments from the Unit of Anatomic Pathology of the Faculty of Veterinary Medicine of Naples to the Unit of Pathology of the Faculty of Veterinary Medicine of Messina, Italy. The diagnoses were compared with conventional light microscopy interpretation at a later date. Overall, a good agreement there was between telecytodiagnosis and conventional glass slides diagnosis (70%). The concordance of telecytodiagnosis was over 90%. Our results demonstrate the usefulness of telepathology by Internet multimedia electronic e-mail in cytologic diagnosis.

Key words: telepathology, diagnostic cytology.

INTRODUZIONE

Il delicato compito del patologo è fornire nel più breve tempo possibile precise informazioni diagnostiche che consentano al clinico/chirurgo di scegliere la strategia terapeutica più adatta. Per poter effettuare ciò il patologo deve conoscere perfettamente la storia clinica del paziente in modo da poter adattare e rendere compatibili le proprie osservazioni con il caso in esame. Il microscopio non è "una sfera di cristallo" che permette di vedere qualcosa di inequivocabile o di assoluto. E' semplicemente uno strumento attraverso il quale il patologo interpreta lesioni e alterazioni tissutali alla luce delle proprie conoscenze e della propria esperienza. E' fondamentale, quindi, lo scambio di pareri con i colleghi. Alcune volte il parere viene richiesto per avere un "conforto" in una diagnosi incerta, altre volte si brancola nel buio e il parere è essenziale per il corretto inquadramento del caso. Il patologo, generalmente non trova difficoltà nel confrontare le proprie opinioni con colleghi che ritiene esperti in uno specifico campo della diagnostica microscopica. Confronto che, è avvenuto ed avviene tutt'ora, con i mezzi tradizionali (attraverso spedizione postale o più recentemente tramite corriere) e che, oggi, in Medicina Umana avviene, anche attraverso la Telepatologia, una tecnica nuova e innovativa che consente di trasmettere via Internet in tutto il mondo, e in tempo reale, immagini digitali acquisite al microscopio tramite telecamere. Alla luce di queste considerazioni, nasce il nostro studio.

MATERIALI E METODI

20 casi citologici sono stati esaminati indipendentemente e contemporaneamente da 3 patologi "esperti" ed una diagnosi finale è stata riportata. Nella maggior parte dei casi, la diagnosi citologica formulata da ciascun patologo è stata messa a confronto con la diagnosi istologica definitiva. Le immagini sono state poi catturate mediante un sistema di acquisizione (ACT1 version 2.51, Nikon) composto da una telecamera digitale ad alta risoluzione (Nikon DXM1200F con 3840x3072 pixel) montata su un microscopio Nikon Eclipse E600 e connessa ad un Pentium IV contenente una scheda di acquisizione (Matrox) (Fig. 1). Per ogni caso sono state acquisite almeno sei immagini (2 a piccolo, 2 a medio e 2 a forte ingrandimento), importate direttamente in Adobe Photoshop 5.0. e salvate, in formato JPG in un file e inviate, insieme ai dati anagrafici e anamnestici riguardanti il caso (storia clinica del paziente, eventuale diagnosi clinica, ecc.), tramite posta elettronica alla Sezione di Anatomia patologica della Facoltà di Medicina Veterinaria di Messina per il teleconsulto (Fig. 2A,B,C). Le immagini ricevute dalla sezione consulente erano visualizzate sul monitor del computer e una diagnosi veniva formulata. Dopo aver ricevuto una risposta della lettura virtuale si è passati all'invio dei vetrini veri e propri per una conferma.

RISULTATI

La diagnosi è stata classificata di concordanza quando corrispondeva con quella del patologo richiedente, di lieve discordanza se il giudizio si discostava leggermente, mentre è stata definita di discordanza grave quando le diagnosi erano totalmente diverse.

Nell'80% (16/20) dei casi si è avuta totale concordanza, nel 15% (3/20) si avuta lieve discordanza e in 1 solo caso si è avuta grave discordanza (5%). Inoltre nel 95% dei casi la diagnosi virtuale concordava con quella convenzionale e nell'85% dei casi la diagnosi citologica è risultata concordare con la diagnosi istologica. La qualità delle immagini erano generalmente buone (come riportato dal ricevente) e in 1 solo caso il telecitopatologo ricevente aveva richiesto ulteriori immagini.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

I risultati del nostro studio sottolineano i numerosi vantaggi legati all'uso della telepatologia nella citologia diagnostica e in particolare:

- l'applicazione routinaria
- il basso costo
- la velocità (per la preparazione dei vetrini virtuali ci vogliono approssimativamente 30 minuti)
- i tempi di risposta breve (da pochi minuti ad uno/due giorni)
- l'attendibilità che è quasi pari a quella convenzionale
- la migliore qualità della diagnosi.

Ma ne sottolineano anche i pochi svantaggi e soprattutto il fatto che:

- La risposta è legata al campione inviato dal richiedente (singole immagini selezionate come rappresentative)
- La qualità delle immagini non è sempre idonea

Questi svantaggi possono essere superati con l'uso della telepatologia robotizzata: cioè con l'uso di un microscopio motorizzato ad alta precisione che permette di manipolare le immagini esattamente come si farebbe con il proprio microscopio.

Risulta chiaro che condivisione e discussione a distanza sono possibili nella misura in cui gli operatori siano in possesso di strumenti, di un metodo di lavoro e di un linguaggio comuni.

L'attivazione di questo servizio su scala regionale rappresenta l'obiettivo primo di un progetto ben più vasto che prevede la creazione di una rete telematica che colleghi i diversi centri oncologici nazionali tra loro e successivamente con quelli internazionali. La possibilità di ottenere procedure diagnostiche, e quindi terapeutiche, adeguate, indipendentemente dalla sede, rappresenta un'esigenza fondamentale nel trattamento del paziente oncologico e a questa sono indirizzati gli sforzi messi in atto dal settore di Anatomia patologica del Dipartimento di Patologia e Sanità animale della Facoltà di Medicina Veterinaria di Napoli per uniformare le prestazioni oncologiche di diagnosi e di terapia a uno standard ottimale e comune a tutti gli operatori e a tutte le sedi.

BIBLIOGRAFIA

Clemente C. e Scopsi L. Telepatologia .Strumenti, problemi e applicazioni. C.G. Edizioni Medico Scientifiche,2000; Marchevsky AM., Nelson V., Martin SE, Greaves TS, Raza AS, Zeineh J, Cobb CJ. Telecytology of fine-needle aspiration biopsies of the pancreas: A study of well-differentiated adenocarcinoma and chronic pancreatitis with atypical epithelial repair changes. Diagnostic Cytopathology, 28, 147-152,2003; Della Mea V, Puglisi F, Bonzanini M, Forti S, Amoroso V, Visentin R, Della Palma P, Beltrami CA. Fine-needle aspiration cytology of the breast: A

**NUOVE FRONTIERE DELLA DIDATTICA?
UN CORSO DI CITOPATOLOGIA VETERINARIA IN E-LEARNING**

Giuliano Bettini⁽¹⁾, Manuela Colin⁽²⁾, Enrico Vezzali⁽¹⁾, Maria Morini⁽¹⁾

Alma Mater Studiorum Università di Bologna

⁽¹⁾ *Facoltà di Medicina Veterinaria - Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale*

⁽²⁾ *CITAM – Centro Interfacoltà per le Tecnologie Didattico-Educative Teleaudiovisive «Guglielmo Marconi»*

Gli enormi progressi registrati negli ultimi anni dalle tecnologie digitali e dell'informazione hanno determinato un crescente interesse e sviluppo dei sistemi di formazione a distanza on-line (e-learning). In questo panorama, recentemente normato dal DM 17 aprile 2003 relativo al riconoscimento dei corsi di formazione a distanza di livello universitario, l'Università di Bologna ha avviato un programma teso a coordinare e armonizzare le iniziative e-learning già esistenti ed a favorire l'attivazione di nuovi corsi e-learning. In questo contesto è stata realizzata dal centro interfacoltà per le tecnologie multimediali CITAM una piattaforma software (AlmaChannel) in grado di supportare in modo adeguato i corsi e-learning.

La scelta di una piattaforma sviluppata internamente, in alternativa all'adozione di software commerciali già esistenti, è derivata dalla volontà di dotarsi di uno strumento flessibile, che permettesse personalizzazioni e sviluppi completamente integrati, anche per poter sperimentare nuovi modelli didattici. Il ricorso a tecnologie open source, come Java, Linux, PostgreSQL, ha inoltre consentito un notevole risparmio sui costi di infrastruttura. Dal punto di vista tecnico, l'adozione della tecnologia J2EE (Java Enterprise Edition) ha consentito la completa scalabilità dell'hardware (numero illimitato di utenti) e la portabilità e compatibilità di AlmaChannel con i sistemi operativi e standard esistenti. Il collegamento dell'utente ad AlmaChannel avviene con una normale interfaccia web, senza necessità di installare alcun software specifico, previa autenticazione tramite username e password; i dati transitano sulla rete in forma criptata con un servizio SSL (Secure Socket Layer) che consente l'utilizzo del protocollo HTTPS e la possibilità di tracciare, a fini sia didattici che di sicurezza, tutte le azioni compiute da un particolare utente.

Il corso "Diagnostica citopatologica veterinaria" è stato uno dei primi a sperimentare la piattaforma AlmaChannel ed è la prima esperienza nella Facoltà di Medicina Veterinaria di un corso realizzato interamente in modalità e-learning. Si tratta di un corso di 3 CFU, attivato fra gli insegnamenti specialistici opzionali che la facoltà propone agli studenti nell'ambito dei 15 crediti formativi di libera scelta e che per il corrente anno accademico è stato scelto da 30 studenti sui 150 iscritti al quinto anno. Il corso è articolato in 15 moduli ed è strutturato secondo una modalità di e-learning blended e asincrono, in cui tutta la didattica tradizionale ex-cattedra è sostituita da materiale didattico reso disponibile in rete, mentre l'attività pratica al microscopio avviene nelle aule di esercitazioni. Ciascun modulo, corrispondente da un punto di vista formale ad una lezione di due ore, tratta un argomento specifico (es. Classificazione citologica delle neoplasie, Citopatologia dei versamenti, ecc.) ed è generalmente costituito da una presentazione Powerpoint® autoesplicativa, da testi originali in formato PDF® e da collegamenti a siti Internet in cui lo studente può trovare approfondimenti agli argomenti trattati nel modulo; i moduli sono pubblicati su AlmaChannel seguendo un calendario prestabilito, con una cadenza di circa dieci giorni. Il contatto con la "classe virtuale" avviene tramite la posta elettronica e soprattutto con lo strumento del forum (ad ogni modulo è collegato un forum), attraverso il quale il docente può sollecitare riflessioni sull'argomento trattato, verificare passo-passo la progressione nell'apprendimento ed eventualmente proporre esercizi, alla cui risoluzione può corrispondere una valutazione visualizzabile on-line dall'interessato nel registro-studenti del corso. Il materiale presente nei moduli è integrato da una sezione contenente riferimenti bibliografici e da una galleria di immagini, in cui saranno anche inseriti preparati citologici acquisiti con la tecnologia del vetro virtuale, che permette una realistica simulazione on line del lavoro al microscopio.

Altri strumenti disponibili in AlmaChannel sono la Chat, che consente di effettuare incontri ed eventi on line sincroni fra docenti, tutor e studenti in stanze pubbliche o private, con la possibilità di organizzare simulazioni e laboratori virtuali finalizzati all'apprendimento, mentre nell'Area Documenti apposite cartelle Scambio, Appunti ed Elaborati consentono una condivisione della documentazione necessaria, di qualunque dimensione e codificata in qualunque formato elettronico. Il sistema permette inoltre la realizzazione di statistiche, globali o per singolo studente, degli accessi per settimana o per giorno della settimana e delle visite ai contenuti dei Moduli Didattici o di altre specifiche aree della piattaforma.

Anche se alcuni studenti avevano dichiarato all'inizio del corso una scarsa familiarità con le tecnologie informatiche, la fruibilità di AlmaChannel è stata giudicata semplice ed intuitiva da tutti gli utenti, che, in questa esperienza, hanno dimostrato di apprezzare molto l'opportunità di seguire un corso a distanza, soprattutto per la possibilità offerta dall'e-learning di individualizzare e personalizzare le fasi dell'apprendimento e di conciliarle con altre esigenze formative, considerata anche la notevole sovrapposizione degli impegni didattici e di tirocinio nell'ultimo anno di corso. Dal punto

Associazione Italiana di Patologia Veterinaria

di vista del docente, l'usabilità della piattaforma AlmaChannel è risultata parimenti semplice ed intuitiva; l'aspetto più impegnativo nella gestione di un corso in e-learning risiede non tanto negli ostacoli tecnici, quanto nella necessità di pianificare accuratamente a priori tutta l'architettura del corso, con modalità molto diverse da quelle di un corso "tradizionale". Si è trattato in definitiva di un'esperienza interessante, che ha fra l'altro dimostrato come anche nelle discipline rigorosamente pratiche la didattica frontale possa essere ampiamente integrata da momenti di formazione a distanza e che riteniamo possa essere proposta con successo, oltre che nei corsi di laurea, anche nell'ambito dei programmi di educazione permanente ed aggiornamento post laurea.

Parole chiave: e-learning, citologia, anatomia patologica, didattica, Internet.

NEW APPROACHES IN TEACHING VETERINARY PATHOLOGY?. A E-LEARNING COURSE OF CYTOPATHOLOGY.

Recent advances in digital and informative technologies has encouraged a growing interest and development of e-learning systems. In this perspective, the University of Bologna has started a program to support e-learning activities, and, in order to harmonize these projects, the interfaculty center for multimedia technologies CITAM has created the e-learning platform AlmaChannel.

AlmaChannel has been designed as a modular structure in compliance with the J2EE technology (Java Enterprise Edition); this allows the use of the platform to any number of users by properly scaling the application and database servers and its complete portability and compatibility. All available services can be accessed from any standard web interface and no specific software is required on the client side. Data are exchanged in encrypted form by the use of a SSL service (Secure Socket Layer), which allows the use of the HTTPS protocol; the operational security of the platform include also an authentication service and the possibility to trace all actions performed in the context of navigation sessions, for both educational or security purposes.

The optional course "Diagnostic veterinary cytopathology" has been among the first to test AlmaChannel, and is the first e-learning experience at the Faculty of Veterinary Medicine. The course is structured as a blended and asynchronous e-learning system in 15 modules, which are published on AlmaChannel following a specific schedule; each module includes a self-explaining PowerPoint® presentation, a PDF® text and links to appropriate web sites. The contact with the virtual class is maintained by e-mail and by discussion forums linked to each module. Other available tasks are a image gallery, a link to specific references and a virtual slide section.

The course has been greatly appreciated by the students, as for the easy and intuitive use of AlmaChannel, as for the possibility to individualize and personalize the learning processes. On the teacher side, e-learning courses need a careful planning and preparation. E-learning approach can nevertheless be adopted also for practical subjects to integrate or substitute lectures, and, besides under-graduated courses, it could be a powerful tool in post graduated veterinary continuing education.

Key words: e-learning, cytology, pathology, teaching, Internet.

ASPETTI CITOLOGICI DEI TIMOMI E CORRELAZIONE CON LA CLASSIFICAZIONE ISTOLOGICA

Dell'Orco Marta, Spiranelli Eleonora, Bertazzolo Walter

Pronto Soccorso Veterinario, Via Defendente, 29/a 26900 Lodi

Gli autori valutano le caratteristiche citologiche dei timomi e la correlazione tra l'aspetto citologico e la classificazione istologica.

Sei campioni citologici compatibili con diagnosi di timoma e con successiva conferma istologica sono stati prelevati dall'archivio personale di uno degli autori (Bertazzolo). I campioni sono stati ottenuti per biopsia con ago sottile (FNAB) mediante ago da 22 Gauge direttamente dalla massa mediastinica o dalle metastasi polmonari. I campioni istologici sono stati ottenuti per biopsia escissionale in corso di chirurgia o in sede autoptica. I campioni citologici sono stati rivalutati per contaminazione ematica, cellularità e popolazione cellulare predominante. In particolare quando le cellule epiteliali costituivano il 70% o più della popolazione cellulare, il campione veniva classificato come epiteliale, quando le cellule linfoidi costituivano il 70% o più della popolazione cellulare il campione veniva classificato come linfocitico. Nei restanti casi il campione veniva classificato come misto. Inoltre sono state valutate la citomorfologia delle cellule epiteliali e delle cellule linfoidi, la presenza delle corpi di Hassall e la presenza di altre cellule, in letteratura occasionalmente associate a timoma (e.g. mastociti). I campioni istologici sono stati rivalutati utilizzando una classificazione istologica umana. In accordo con tale classificazione, i timomi sono stati distinti in epiteliali, linfocitici e misti. Quelli epiteliali sono stati distinti in fusati o rotondocellulari. La morfologia citologica è stata poi correlata con lo schema classificativo istologico per valutarne il grado di corrispondenza. Tutti i campioni citologici presentavano un'abbondante contaminazione ematica. La cellularità era da scarsa a moderata. In accordo con tutti gli autori 5 casi citologici su 6 sono stati valutati come linfocitici ($L \geq 70\%$), 1 caso su 6 epiteliale ($E \geq 70\%$). I campioni istologici sono stati valutati come misti (4/6), epiteliale (1/6) e linfocitico (1/6). Solo in 2 casi su 6 si è verificata una corrispondenza tra aspetto citologico e aspetto istologico.

Parole chiave: cane, gatto, timoma, citologia, istologia.

CYTOLOGICAL FEATURES OF THYMOMA AND CORRELATION WITH HISTOLOGICAL CLASSIFICATION

Six cytological samples suggestive of thymoma and with histological confirmation were taken from the personal database of one of the author (Bertazzolo). Samples were obtained by fine-needle aspiration biopsy (FNAB) from mediastinal mass or pulmonary metastasis. Histological samples were taken by biopsy during surgery or necropsy. Cytological samples were revalued for blood contamination, cellularity, proportion of lymphocytes and epithelial cells and cellular morphology. Histological samples were classified as epithelial, lymphocytic or mixed according to a human classification.

Cytologic morphology was correlated with histological classification; 5/6 cytological samples were considered lymphocytic and 1/6 epithelial. Histological samples were considered as mixed (4/6), epithelial (1/6) and lymphocytic (1/6). Agreement between cytology and histology was presented only in 2/6 samples.

Key words: dog, cat, thymoma, cytology, histology.

**CARCINOMA POLMONARE ADENOSQUAMOSO IN UN CANE:
RILIEVI CITOLOGICI ED ISTOPATOLOGICI**

Masserdotti Carlo*, Bonfanti Ugo**, De Lorenzi Davide***, Dimauro Corrado****

*Laboratorio Biodiversity, Brescia,

**Clinica Veterinaria Gran Sasso, Milano

*** Clinica Veterinaria S.Marco, Padova,

**** Clinica Veterinaria S.Antonio, Salò (BS)

Un cane, razza Shih-Tzu, sesso maschile, età 8 anni, è stato sottoposto a visita clinica per l'insorgenza di tosse secca ed evoluzione in dispnea grave. L'esecuzione delle indagini ispettive, auscultatorie e strumentali ha permesso l'identificazione di una voluminosa massa, localizzata nel parenchima polmonare del lobo apicale sinistro. L'indagine diagnostica tramite lavaggio alveolo-bronchiale ed esame citologico ha evidenziato l'esfoliazione di numerosi elementi epiteliali, generalmente singoli, con caratteri di differenziazione squamosa, rappresentati da citoplasmi poligonali intensamente basofili e nuclei dismetrici a cromatina zollata. Il perfezionamento diagnostico tramite agoaspirazione transcutanea ecoassistita del parenchima neoplastico ha individuato la presenza di caratteri citologici riferibili ad una neoplasia epiteliale maligna con caratteri ghiandolari, cui si associavano i già identificati aspetti di differenziazione squamosa; questi caratteri erano rappresentati da vacuolizzazione del citoplasma, polarità nucleare e disposizioni microacinari degli elementi neoplastici. I dati provenienti dai due metodi di indagine citologica permettevano quindi di formulare una diagnosi di neof ormazione polmonare epiteliale maligna con aspetti di differenziazione ghiandola re e squamosa, suggestiva di carcinoma adenosquamoso, in seguito confermata dall'indagine istopatologica eseguita sul tessuto neoplastico rimosso chirurgicamente. Il caso in questione sottolinea come l'integrazione tra i dati provenienti dalla citologia esfoliativa e dalla citologia agoaspirativa permetta di rilevare aspetti del comportamento di una popolazione neoplastica dipendenti da condizioni anatomiche, quali l'invasività degli elementi neoplastici nel lume respiratorio e dalla tendenza a diversi tipi di differenziazione in dipendenza dell'area lesionale.

Parole chiave: cane, carcinoma polmonare adenosquamoso, citologia.

**ADENOSQUAMOUS PULMONARY CARCINOMA IN A DOG: CYTOLOGIC AND HISTOPATHOLOGIC
FEATURES.**

A male, 8-years-old, Shih-Tzu dog was referred to our attention for coughing and severe dispnoea. Clinical and instrumental examination revealed a large pulmonary mass, localized in the left apical lobe. Diagnostic investigation by bronchoalveolar lavage (BAL) and cytologic examination showed the presence of many single epithelial cells, with features of squamous differentiation, like polygonal shape of cytoplasms and clumped chromatin. Further examination by ultrasound-guided fine needle aspiration (FNA) allowed to identify the presence of glandular features of the neoplastic cells, associated with the previous observed features of squamous differentiation; this characters were represented by polarity of the nuclei, cytoplasmic vacuoles and acinar arrangements. Cytologic data collected by two different methods led to a final diagnosis of malignant epithelial tumor with both glandular and squamous differentiation, suggestive of pulmonary adenosquamous carcinoma. Histopathologic examination on surgical removed tissue confirmed the cytologic diagnosis. This selected case emphasizes the importance of integration between data from exfoliative and agoaspirative cytology; this integration permits the identification of neoplastic behaviour, like invasivity into bronchial lumen of neoplastic cells and the tendency to variable areas of differentiation of the same neoplastic population.

Key words: dog, pulmonary adenosquamous carcinoma, cytology.

FASCITE NECROTIZZANTE DA *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* IN UNO SHAR PEI AFFETTO DA MUCINOSI IDIOPATICA

Avallone Giancarlo*, Guarnieri Donatella[§], Arrigoni Susanna[§], Grilli Guido*, Roccabianca Paola*

* DiPAV-Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Milano

[§] Libere professioniste, Ambulatorio Veterinario Santa Eufemia, Via S. Senatore 14, Milano

La mucinosi idiopatica dello Shar Pei deriva da un eccessivo accumulo di mucopolisaccaridi acidi nel derma. La patologia in genere regredisce o spontaneamente o a seguito di terapia steroidea. Uno Shar Pei femmina di 1,5 anni con mucinosi steroideo-resistente e ricorrenti episodi febbrili della durata di 5 mesi presentava improvvisa insorgenza di bolle emorragiche cutanee. Dopo il decesso spontaneo si procedeva ad un esame autoptico e al prelievo dei tessuti per l'esame istologico di routine. Sezioni di cute e muscolatura venivano inoltre colorate con Alcian blu a pH 2.5, Alcian-PAS e GRAM. L'essudato veniva raccolto per l'esame batteriologico. L'esame macroscopico evidenziava bolle ed ulcere cutanee nel piatto delle cosce ed un infarcimento emorragico a carico dei muscoli mediali della coscia con estensione al cavo pelvico e alla regione retroperitoneale. La milza presentava infarti multipli. All'istologia erano evidenti bolle emorragiche dermo-epidermiche associate a grave mucinosi (confermata dalle colorazioni speciali) associate alla presenza di batteri Gram positivi. Erano inoltre presenti pannicolite e miosite necrotico-emorragiche. Dall'essudato veniva isolato *Staphylococcus aureus*. L'improvvisa insorgenza, il rapido decorso e la tipologia delle lesioni erano compatibili con la diagnosi di fascite necrotizzante. La storia clinica ed i reperti istopatologici suggerivano una patogenesi da immunodepressione farmacologica, episodi di batteriemia (scarsa clearance batterica), fascite batterica secondaria, setticemia e CID settica. I reperti erano simili alla fascite necrotizzante di tipo II ed in parte paragonabili alla "Scalded Skin Syndrome" descritte nell'uomo.

Parole chiave: Mucinosi idiopatica, *Staphylococcus aureus*, Fascite, *Scalded Skin Sindrome*.

***STAPHYLOCOCCUS AUREUS* NECROTIZING FASCITIS IN A SHAR PEI WITH IDIOPATHIC MUCINOSIS**

Idiopathic dermal mucinosis derives from excessive deposition of acid mucins and develops in Shar Peis. A female 1.5 years old Shar Pei dog with unresponsive mucinosis had recurring febrile episodes of 5 months duration. The dog suddenly developed blood filled bullae. After the spontaneous decease a full necropsy was performed and tissues were collected for routine histology and special stains and bacteriology. Gross pathology was characterized by hemorrhagic bullae and ulcers in the skin and muscular haemorrhages in the hind limbs. Lesions extended to the pelvic and retroperitoneal regions. Dermoepidermal hemorrhagic bullae and necrotico-hemorrhagic panniculitis and myositis were confirmed by histology. Special stains identified acid mucins in the bullae and presence of Gram positive bacteria in the lesions. *S. aureus* was isolated. The sudden onset, the rapid evolution and the type of lesions were consistent with a necrotizing fascitis. Clinical history and pathologic findings indicated a pathogenesis characterized by pharmacological immunodepression, recurrent bacteriemia with lack of bacterial clearance, fascitis and septicemia with DIC. Findings paralleled descriptions of type II necrotizing fascitis and *Scalded Skin Syndrome* in man.

Key Words: Idiopathic mucinosis, *Staphylococcus aureus*, Fascitis, *Scalded Skin Sindrome*.

IDENTIFICAZIONE DI *HELICOBACTER* SPP. NELLO STOMACO DEL GATTO MEDIANTE LAVAGGIO GASTRICO

Pregel Paola*, Gastaldi Giovanna*, Palmerini Domenico*, Appino Simonetta[§]

*Dipartimento di Patologia Animale, Università degli Studi di Torino

Via L. Da Vinci 44, 10095 Grugliasco (TO)

[§]Dipartimento di Patologia Generale, Anatomia Patologica e Clinica Ostetrico-Chirurgica Veterinaria Università degli Studi di Sassari

Via Vienna 2, 07100 Sassari

Il genere *Helicobacter* contiene almeno 18 specie che colonizzano il tratto gastrointestinale di ospiti diversi. In letteratura l'infezione da *Helicobacter spp.* nel gatto è riportata con una prevalenza compresa tra il 41% ed il 100%. Alcuni studi hanno evidenziato nel gatto la presenza di *H. pylori* e *H. heilmannii*, potenziali agenti zoonotici.

Lo scopo del presente lavoro è stato di verificare la presenza di *Helicobacter* nel contenuto gastrico prelevato ambulatorialmente da gatti domestici mediante lavaggio gastrico, metodica non invasiva, che consentirebbe una migliore collaborazione con proprietari e veterinari clinici nel rilevamento della diffusione del batterio nella popolazione felina.

I campioni esaminati sono stati prelevati da gatti presentati ad un ambulatorio veterinario per essere sottoposti ad interventi chirurgici (soprattutto sterilizzazioni e castrazioni). Sono stati raccolti 11 campioni di contenuto gastrico, sottoposti a citocentrifugazione ed esame citologico (May Grünwald-Giemsa). Inoltre, il DNA estratto dai campioni è stato sottoposto a PCR, per mettere in evidenza un frammento del gene per il 16S rRNA di *Helicobacter*. Tutti i campioni sono risultati positivi. Il sequenziamento nucleotidico ha permesso di identificare *H. heilmannii* in uno dei casi. La metodica di prelievo utilizzata nel presente studio si rivela pertanto particolarmente utile nel monitoraggio della diffusione di *Helicobacter* nella popolazione felina, in quanto non invasiva, affidabile e facilmente realizzabile anche nelle piccole realtà ambulatoriali.

Parole chiave: Gatto, *Helicobacter*, Gastrite.

IDENTIFICATION OF *HELICOBACTER* SPP. IN GASTRIC WASHINGS IN CAT.

The bacterial genus *Helicobacter* contains at least 18 species which colonise the gastrointestinal tract of several mammalian and avian hosts. In literature, *Helicobacter spp.* infection in cats is reported with a prevalence between 41% and 100%. Several studies showed the presence in cat of *H. pylori* e *H. heilmannii*, potential zoonotic agents. The aim of this work was to show the presence of *Helicobacter* in feline gastric washings collected in small animals veterinary clinics.

The samples were collected from cats presented for surgical operations. Eleven gastric fluids were centrifuged and submitted to cytological examination (May Grünwald-Giemsa). Besides, the DNA extracted from samples was examined by PCR, in order to reveal a fragment of 16S rRNA gene of *Helicobacter*. All tested samples resulted positive. Nucleotide sequencing allowed to identify *H. heilmannii* in one case.

The collection method revealed to be useful in monitoring *Helicobacter* spread in feline population, being non-invasive, reliable and easily feasible.

Key words: Cat, *Helicobacter*, Gastritis.

L'ESAME CITOLOGICO APPLICATO A PRELIEVI TC GUIDATI

Rondena Marco, Ghisleni Gabriele, Roccabianca Paola, Di Giancamillo Mauro¹, Giudice Chiara, Caniatti Mario

Dipartimento di patologia animale, Igiene e Sanità pubblica Veterinaria.

¹ *Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie*

Tra i vantaggi che il clinico trae dall'utilizzo della Tomografia Computerizzata (TC) c'è la possibilità di effettuare prelievi mini invasivi, citologici ed istologici, molto accurati grazie alla elevata definizione dello strumento. La possibilità di effettuare una diagnosi citologica rapida rende il clinico in grado di operare subito una terapia adeguata. In medicina veterinaria non sono tuttavia molti gli studi riguardanti l'efficacia di tale tecnica e la maggior parte di essi riguardano semplicemente la descrizione della tecnica di prelievo. Per contro sono state poco indagate le problematiche relative all'affidabilità diagnostica della citologia applicata ai prelievi TC guidati. Questa rassegna si propone di valutare l'affidabilità della lettura citologica di prelievi TC guidati comparandoli, quando possibile, con l'istologia. Sono stati considerati 118 prelievi citologici TC guidati il 35% dei quali con relativa biopsia istologica, arrivati al nostro laboratorio fra la fine del 2001 e l'inizio del 2005. I campioni citologici sono colorati con colorazione May Grünwald – Giemsa, mentre i campioni istologici sono stati fissati in formalina, processati per l'inclusi in paraffina e colorati con Ematossillina Eosina. Per 90 casi su 118 (77%) la citologia è risultata diagnostica, in particolare il 60% è risultato positivo ed il 17% negativo per neoplasia; l'11% (13 casi su 118) è stato considerato falso negativo, in particolare i problemi maggiori sono stati riscontrati con sarcomi, neoplasie di origine vascolare ed, ancora, con neoplasie comprendenti ampi centri di necrosi in cui il reperto citologico era dominato da questo aspetto, mentre il 12% (14 casi) è risultato non conclusivo. Sebbene i dati a nostra disposizione sono preliminari e vanno quindi approfonditi con ulteriori indagini, la biopsia citologica CT guidata risulta spesso conclusiva ed offre al clinico un valido supporto su cui impostare una terapia appropriata.

Parole chiave: biopsia TC guidata, citologia, istologia.

CYTOLOGY OF CT SCAN GUIDED BIOPSIES.

The clinician can perform mini invasive biopsies with elevated accuracy by means Computerized Tomography (CT) scan. A cytological diagnosis is important for ensure correct and immediate therapeutic choices. Few studies have been performed, in veterinary medicine, concerning efficacy of cytology applied to CT scan guided biopsies. Aim of the study: to test cytologic diagnosis in CT scan guided biopsies, and to compare cytological and histological results. One hundred and eighteen CT scan guided biopsies, performed from 2001 to 2005, were retrospectively considered. Thirty five percent had an histological counterpart. Samples were stained with May Grünwald Giemsa stain for cytology. Histological samples were routinely processed and H.E. stained. An immediate cytological diagnosis was given in 77% of samples: 60% were positive for neoplasia and 17% were negative. 11% were false negative, 12% were no diagnostic. CT scan guided cytological biopsy give an elevate rate of definitive diagnosis and can be helpful for clinician in planning a correct therapy.

Key words: CT scan biopsy, cytology, histology.

**RILIEVI CITOLOGICI IN 11 CASI DI VERSAMENTO PERITONEALE IN CORSO DI NEOPLASIA OVARICA
NEL CANE**

Bonfanti Ugo*, Bertazzolo Walter**, Masserdotti Carlo#, De Lorenzi Davide§, Ferro Silvia¶

* *Clinica Veterinaria Gran Sasso, Milano*

** *Pronto Soccorso Veterinario, Lodi*

Laboratorio Biodiversity, Brescia

§ *Clinica Veterinaria San Marco, Padova*

¶ *Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata ed Igiene Veterinaria, Università degli Studi di Padova*

Le neoplasie ovariche sono poco frequenti in medicina veterinaria. La nostra casistica ha compreso 11 casi di neoplasie ovariche, istologicamente confermate, che hanno causato la presenza di versamento peritoneale. Le neoplasie associate a versamento peritoneale sono state l'adenocarcinoma papillare (8), il tumore delle cellule della granulosa (2) ed un tumore gonadostromale misto. In 7 casi su 8, nei soggetti affetti da adenocarcinoma papillare, nel versamento erano presenti cellule derivanti dalla neoplasia. Le caratteristiche citologiche degli strisci preparati dai versamenti erano: elevata cellularità, presenza di voluminosi aggregati tridimensionali di cellule con citoarchitetture papillari, accanto ad aggregati di piccole dimensioni con citoarchitetture acinari. Le cellule, tra loro fortemente coese, tondeggianti, ovalari o cuboidali, con anisocitosi ed anisocariosi di moderata entità, possedevano atipie nucleari di entità variabile e citoplasma moderatamente ampio, grigiastro, talora microvacuolizzato. I due tumori delle cellule della granulosa hanno causato versamento sierematico, senza l'evidenza di cellule neoplastiche. L'unico caso di tumore gonadostromale ha causato la presenza di versamento sierematico con la presenza di cellule neoplastiche derivanti dalla neoplasia. Le caratteristiche citologiche degli strisci ottenuti dal versamento sono state: buona cellularità, aggregati di dimensioni differenti costituiti da cellule moderatamente coese, nuclei dismetrici, nucleoli prominenti ed ampio citoplasma grigiastro spessissimo microvacuolizzato. Si desidera in conclusione sottolineare come in corso di adenocarcinoma papillare dell'ovaio il versamento possa contenere frequentemente cellule derivanti dalla neoplasia ovarica e dalla relativa carcinomatosi peritoneale, a differenza delle altre neoplasie ovariche che solo raramente contengono cellule diagnostiche nel versamento.

Parole chiave: Tumori ovarici, citologia, adenocarcinoma papillare, tumore gonadostromale, cane.

CYTOLOGIC FINDINGS IN 11 CASES OF CANINE ABDOMINAL EFFUSION FROM OVARIAN TUMOR.

Ovarian tumours are uncommon in veterinary medicine. A total of 11 dogs with abdominal effusion due to ovarian neoplasm histologically confirmed were included: papillary adenocarcinoma (8), granulosa cell tumour (2), and a mixed gonadostromal tumour (granulosa cell tumour and luteoma). In abdominal effusion of 7 cases out of 8 papillary adenocarcinomas, neoplastic cells were present. Cytology of the effusions revealed high cellularity, large tridimensional clusters of cells arranged in papillary pattern, and small aggregates of cells with microacinar arrangement. Tightly cohesive, roundish, oval or cuboidal cells with moderate anisocytosis and anisokaryosis, variable nuclear atypia, and scarce to moderate amount of sometimes vacuolated grey cytoplasm were present. Granulosa cell tumours caused serosanguineous effusion without neoplastic cells. Gonadostromal tumour caused serosanguineous effusion with neoplastic cells. Smears of the effusion were characterized by high cellularity, aggregates of moderately cohesive cells, dysmetric nuclei, prominent nucleoli and large grey, often microvacuolated cytoplasm. In conclusion, in case of ovarian papillary adenocarcinoma and carcinomatosis, abdominal effusion may contain cells deriving from ovarian neoplasm, which is different from other ovarian neoplasms which rarely cause abdominal effusion containing neoplastic cells.

Key Words: Ovarian tumours, cytology, papillary adenocarcinoma, gonadostromal tumor, dog.

INTRODUZIONE

Le neoplasie ovariche sono poco frequenti in medicina veterinaria. Esse costituiscono lo 0,5-1,2% di tutte le neoplasie canine. Sono rappresentate dai tumori gonadostromali (tumore delle cellule della granulosa, thecoma, luteoma), dai tumori germinali (disgerminoma, teratoma, carcinoma embrionario), dai tumori epiteliali (adenoma papillare,

cistadenoma papillare, adenocarcinoma papillare, adenoma della rete ovarica) e dai rari tumori mesenchimali (leiomioma, emangioma).

MATERIALI E METODI

La nostra casistica ha compreso 11 casi di neoplasie ovariche, istologicamente confermate, che hanno causato la presenza di versamento peritoneale. 8 casi erano rappresentati da adenocarcinomi papillari (2 meticci, 1 Bassett Hound, 1 Boxer, 1 Cocker Spaniel, 1 Pastore Tedesco, 1 Shih-Tzu, 1 Siberian Husky), in 2 casi da tumori delle cellule della granulosa (1 meticcio, 1 Shih-Tzu), ed in un caso da un tumore gonadostromale misto (1 Golden Retriever)

RISULTATI

In 7 casi su 8, nei soggetti affetti da adenocarcinoma papillare, nel versamento erano presenti cellule derivanti dalla neoplasia. Le caratteristiche citologiche degli strisci preparati dai versamenti erano: elevata cellularità, presenza di voluminosi aggregati tridimensionali di cellule con citoarchitetture papillari, accanto ad aggregati di piccole dimensioni con citoarchitetture acinari. Le cellule, tra loro fortemente coese, tondeggianti, ovalari o cuboidali, con anisocitosi ed anisocariosi di moderata entità, possedevano atipie nucleari di entità variabile e citoplasma moderatamente ampio, grigiastro, talora microvacuolizzato (Figg. 1,2). I due tumori delle cellule della granulosa hanno causato versamento sierosematico, senza l'evidenza di cellule neoplastiche. L'unico caso di tumore gonadostromale ha causato la presenza di versamento sierosematico con la presenza di cellule neoplastiche derivanti dalla neoplasia. Le caratteristiche citologiche degli strisci ottenuti dal versamento sono state: buona cellularità, aggregati di dimensioni differenti costituiti da cellule moderatamente coese, nuclei dismetrici, nucleoli prominenti ed ampio citoplasma grigiastro spessissimo microvacuolizzato (Figg. 3,4).

DISCUSSIONE

Molto frequentemente, in corso di adenocarcinoma papillare si assiste a disseminazione peritoneale di cellule neoplastiche. Fisiopatologicamente tale evento può essere spiegato dall'edema intratumorale che causa fuoriuscita di liquido dalla capsula tumorale, dallo sviluppo di metastasi sulle sierose con conseguente aumento della pressione ed ostruzione dei linfatici delle sierose peritoneale e diaframmatica, e dalla secrezione da parte delle stesse metastasi peritoneali. Tutto ciò causa la presenza di ascite, all'interno della quale sono presenti cellule neoplastiche. I reperti citologici risultano abbastanza caratteristici e risultano ben descritti anche in medicina umana.

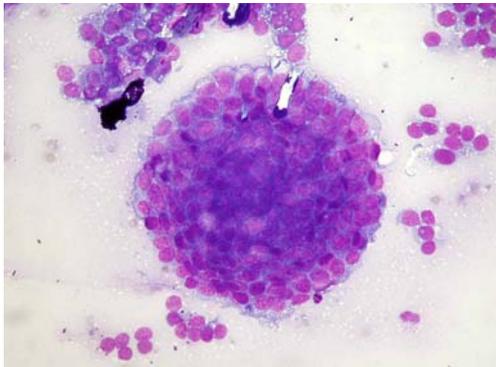
La definizione "gonadostromali" testimonia l'incertezza embriologica ed istogenetica di questo tipo di neoplasie, che possono trarre origine dalle cellule stromali, follicolari, dei tubuli seminiferi, interstiziali ed indifferenziate. E' estremamente rara l'eventualità che le neoplasie delle cellule della granulosa possano determinare metastasi o causare versamento peritoneale; ancor più rara la possibilità, anche in medicina umana, di reperire cellule neoplastiche all'interno di un versamento causato da un tumore gonadostromale.

CONCLUSIONE

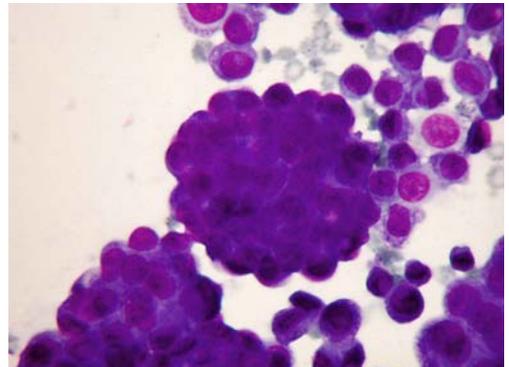
Si desidera in conclusione sottolineare come in corso di adenocarcinoma papillare dell'ovaio il versamento possa contenere frequentemente cellule derivanti dalla neoplasia ovarica e dalla relativa carcinomatosi peritoneale, a differenza delle altre neoplasie ovariche che solo raramente contengono cellule diagnostiche nel versamento. Si desidera infine sottolineare la descrizione di un tumore gonadostromale misto (tumore delle cellule della granulosa e luteoma) che ha causato la presenza di cellule neoplastiche citologicamente rilevabili all'interno del versamento peritoneale, reperto citologico che, a conoscenza degli autori, non è mai stato descritto in medicina veterinaria.

BIBLIOGRAFIA

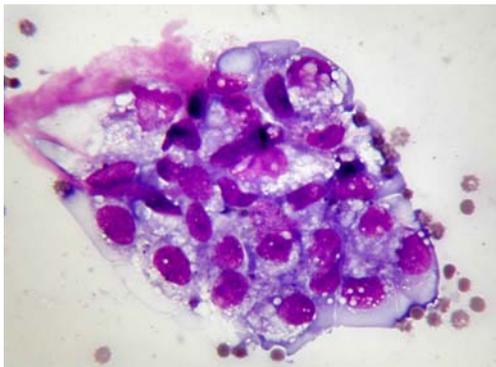
- Anderson GL (1986). Granulosa cell tumor in a dog. *Compendium on the Continuing Education* 8, pp. 158-168.
- Green JA, Richardson RC, Thornhill JA et al. (1979). Ovarian papillary cystadenocarcinoma in a bitch: case report and literature review. *Journal of the American Animal Hospital Association* 15, pp. 351-356.
- Herron MA (1983). Tumors of the canine genital system. *Journal of the American Animal Hospital Association* 19, pp. 981-994.
- Kennedy PC, Cullen, JM, Edwards JF et al. (1998). Tumors of the ovary. In: *Histological classification of tumors of the genital system of domestic animals*, Kennedy PC, Cullen, JM, Edwards JF et al. Armed Forces Institute of Pathology, Eds, Washington DC, pp. 24-28.
- Klein MK (2001). Tumors of the female reproductive system. In: *Small Animal Clinical Oncology*, Withrow SJ, MacEwen EG Eds, WB Saunders Company, pp. 445-454.
- Patnaik AK, Greenlee PG (1987). Canine ovarian neoplasms: a clinicopathologic study of 71 cases, including histology of 12 granulosa cell tumors. *Veterinary Pathology* 24: pp. 509-514.



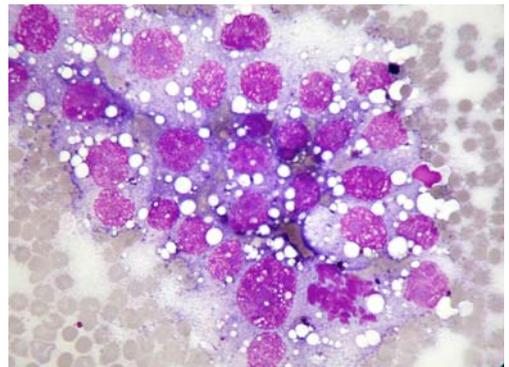
Striscio "tal quale":
Voluminosa papilla tridimensionale costituita da cellule epiteliali coese di forma cuboidale, con anisocariosi moderata, elevato rapporto n/c, e citoplasma grigiastro spesso microvacuolizzato. Cellule singolarmente distribuite sono presenti sullo sfondo del campione (MGG-400x)



Striscio "tal quale":
Piccola papilla costituita da cellule epiteliali ad elevata coesività, di forma cuboidale o tondeggianti e citoplasma basofilo (MGG-1000x).



Striscio "tal quale":
Piccolo aggregato costituito da cellule coese, recanti nuclei moderatamente dismetrici, cromatina fine, nucleoli prominenti ed ampio citoplasma micro- e macrovacuolizzato (MGG-1000x)



Citocentrifugato:
Su sfondo ematico, presente aggregato costituito da cellule lassamente coese con evidente anisocariosi, cromatina grossolanamente granulosa, nucleoli multipli, prominenti, citoplasma grigiastro vacuolizzato. Presente mitosi atipica (MGG-1000x).

LINFOMA EPATICO ASSOCIATO A MASTOCITOMA INTESTINALE IN UN GATTO

Angelo Oseliero, Maria Elena Gelain, Paola Roccabianca, Stefano Comazzi

Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria - Sezione di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviare - Università degli Studi, Milano

Un gatto europeo femmina di 9 anni fu presentato alla visita per progressivo dimagrimento, scarso appetito e astenia. Le condizioni generali si presentavano buone, fatta eccezione per una modica disidratazione. Alla palpazione era rilevabile una massa irregolare nella porzione centrale dell'addome. Esami biochimici ed emocromocitometrico non presentavano alterazioni di rilievo e il gatto risultava negativo ai test sierologici per FIV, FeLV e toxoplasmosi.

All'esame ecografico erano evidenziabili due differenti neoformazioni; la prima, più piccola, in partenza dall'intestino, la seconda, identificata come linfonodo, nonché splenomegalia. La laparotomia rivelava la presenza di una neoformazione digiunale di circa 2 cm, diffusa linfoadenopatia e modico versamento peritoneale.

Furono eseguite enterectomia, splenectomia, biopsia epatica ed esame del midollo osseo con successivi esami citologici multipli per ago aspirazione ecoguidata ed esami biotipici di milza, fegato, intestino, midollo e linfonodi. Su un campione di sangue furono inoltre eseguiti test citofluorimetrici per la determinazione dell'immunofenotipo linfocitario. Gli esami rivelarono la presenza di 2 differenti neoplasie: mastocitoma viscerale e linfoma Ig1 (CD3+/CD8+) con infiltrazione epatica e diffusione sistemica.

Parole chiave: gatto, linfoma, mastocitoma.

HEPATIC LYMPHOMA ASSOCIATED WITH INTESTINAL MASTOCYTOMA IN A CAT.

A domestic short haired female 9 years old cat was referred for progressive weight loss, poor appetite and astenia. General conditions was quite good, except for mild dehydration.

An irregular mass in the middle portion of abdomen was revealed at palpation. CBC and serum chemistry were unremarkable and serology for Toxoplasmosis, Feline Leukemia Virus and Feline infectious Immunodeficiency were negative. Abdominal ultrasonography revealed two different masses, the smaller one starting from small intestine and the second, identified as an altered lymph node and a mild splenomegaly. Multiple FNAB from intestinal mass, spleen, lymph node and liver were performed.

Laparotomy revealed a mass on jejunum, multiple enlarged lymph nodes and mild peritoneal effusion. Splenectomy and enterectomy were performed, peritoneal effusion and bone marrow for cytologic evaluation and liver biopsy for histology were collected. Blood for flow cytometric identification of lymphocyte subset were collected.

Multiple cytological slides has been performed by FNAB and touch imprint from spleen, liver and intestine before histological evaluation. Results of cytology and hystology revealed 2 different neoplasias: visceral mastocytoma and large granular lymphocyte lymphoma (CD3+/CD8+) with hepatic involvement and systemic diffusion.

Key words: cat, lymphoma, mastocytoma.

INTRODUZIONE

La determinazione dell'immunofenotipo in corso di neoplasie linfoidi è una tecnica routinariamente utilizzata in oncoematologia in grado di dare informazioni utili sul fenotipo neoplastico, alla luce della correlazione con aspetti prognostici, sul "commitment" linfocitario o la presenza di fenotipi aberranti suggestivi di neoplasia, o sullo stadio maturativo. Quest'ultimo aspetto è difficilmente indagabile in medicina veterinaria per la scarsità di anticorpi disponibili nei confronti dei differenti stati maturativi. Gli antigeni comuni CD18 e CD45 sono markers di membrana espressi dalla maggior parte delle cellule leucocitarie e dei loro precursori, a differenti livelli di espressione (Grindem, 1996).

L'integrina CD18 è presente a più elevata espressione su granulociti e monociti e risulta coinvolta nel meccanismo di adesione dei leucociti ematici. La glicoproteina CD45 risulta al contrario maggiormente espressa sulla membrana dei linfociti e dei monociti ed è coinvolta nel meccanismo di attivazione cellulare.

Lavori precedenti (Comazzi et al., 2004) hanno evidenziato come in corso di neoplasie acute le cellule immature evidenzino più basse espressioni di antigeni comuni rispetto alla controparte non neoplastica. In medicina umana l'intensità di fluorescenza di CD45 è da alcuni autori (Borowitz et al., 1997) considerata prognostica in alcune leucemie infantili.

Scopo del presente studio retrospettivo è paragonare l'espressione quantitativa degli antigeni comuni CD18 e CD45 nei linfociti di cani sani e negli elementi neoplastici di soggetti con neoplasie linfoidi di differente natura (leucemia cronica, linfoma leucemico, leucemia acuta) ed immunofenotipo (B, T, null) con l'obiettivo di evidenziare eventuali espressioni aberranti in corso di neoplasie linfoidi. Questo potrebbe essere utile non solo per distinguere le cellule neoplastiche da quelle reattive ma anche per stabilire il grado di maturazione delle cellule coinvolte.

MATERIALE E METODI

Su campioni di sangue in EDTA provenienti da 22 cani affetti da neoplasie linfoidi con coinvolgimento ematico di differente natura (leucemie linfoidi croniche -CLL- e acute -ALL- e linfomi leucemici) ed immunofenotipo (T, B e null) e da 13 cani sani di controllo è stata effettuata una doppia marcatura per gli antigeni CD18 e CD45 come precedentemente descritto (Comazzi et al., 2004). L'indice medio di fluorescenza (MFI) inteso come il rapporto tra la fluorescenza media del campione e la fluorescenza aspecifica delle popolazioni linfoidi è stato calcolato sulla popolazione neoplastica e sui linfociti dei soggetti sani ed i risultati sono stati comparati utilizzando test statistici (curve ROC) e valutando le proprietà diagnostiche (sensibilità, specificità, accuratezza, valori predittivi e coefficiente di verosimiglianza) della sovra o sottoespressione degli antigeni in funzione della capacità di distinguere i soggetti neoplastici dai controlli. Le neoplasie sono state inoltre tipizzate in funzione di aspetti clinici, ematologici e dell'immunofenotipo completo (Vernau e Moore, 1999) in 7 tipi differenti: T-CLL, B-CLL, linfomi T, Linfomi B, T-ALL, B-ALL, null-ALL.

RISULTATI

In 5 cani su 22 (23%) e in 1 caso su 22 (5%) si sono evidenziate rispettivamente sotto espressioni o sovraespressioni di CD18 e in 9 cani su 22 (41%) sottoespressioni di CD45, cioè valori di MFI al di fuori del range di riferimento calcolato sul 95% degli individui sani. Unendo i dati, in 11 casi su 22 (50%) sono stati evidenziati valori di MFI al di fuori del range di riferimento per almeno uno dei due antigeni. La valutazione delle curve ROC ha permesso di definire che il valore di MFI soprattutto per il CD45 è in grado di permettere di discriminare tra i soggetti con neoplasia e controlli. Le proprietà diagnostiche dei test variano in funzione dei valori di cut-off e risultano interessanti da un punto di vista diagnostico-pratico per valori di MFI_{CD18} inferiori a 3,8 (sensibilità = 36%, specificità = 85%) e di MFI_{CD45} inferiori a 52 (sensibilità = 45%, specificità = 92%). La valutazione del coefficiente di verosimiglianza (LR o Likelihood Ratio) ha permesso di determinare i valori di cut-off più utili da un punto di vista diagnostico. In particolare campioni con valori di MFI_{CD18} inferiori a 3,1 hanno 3,5 volte più la probabilità di essere neoplastici e campioni con MFI_{CD45} inferiori a 52 addirittura 5,9 volte in più.

La scarsa casistica non ha permesso di trarre considerazioni conclusive sui vari tipi di neoplasia. Tuttavia 2 T-CLL su 2 hanno evidenziato MFI_{CD18} superiore alla media dei controlli e in un caso al di sopra del limite massimo, 2 B-CLL su 2 hanno evidenziato MFI_{CD18} inferiore al limite minimo e 1 ALL null su 2 ha evidenziato MFI_{CD18} inferiore al limite minimo. Per quello che riguarda l'MFI_{CD45} valori inferiori al limite minimo sono stati riscontrati in 1 B-CLL su 2, 2 linfomi-T su 3, e 2 ALL-null su 2.

DISCUSSIONE

La evidenziazione di alterazioni quantitative nell'espressione di CD18 e CD45 è una evenienza frequente circa nella metà dei soggetti con neoplasie linfoidi ed è in genere riconducibile ad una diminuita espressione di uno o entrambi gli antigeni. Solo nelle T-CLL si assiste ad un aumento della espressione di CD18 mentre in rarissimi casi (2/22 = 9%) si sono evidenziate espressioni di MFI_{CD45} superiori alla media dei controlli. Soprattutto la bassa espressione di MFI_{CD45} può essere sufficientemente predittiva di neoplasia ed aiutare pertanto a distinguere le cellule linfoidi neoplastiche da quelle non neoplastiche. Per quello che riguarda le diverse classi di neoplasie i dati sono troppo scarsi per trarre considerazioni conclusive, tuttavia le CLL più spesso mostrano una sovraespressione di CD18 se ad immunofenotipo T e una sottoespressione di entrambi gli antigeni se ad immunofenotipo B, i linfomi leucemici mostrano spesso espressioni variabili e sovrapponibili a quelle dei controlli, mentre le leucemie acute, soprattutto se ad immunofenotipo B o nullo, esprimono spesso basse concentrazioni di CD45 e CD18.

Dai risultati preliminari ottenuti emerge come l'espressione degli antigeni comuni possa essere utile per distinguere neoplasie linfoidi da leucocitosi reattive. L'utilizzo di un sistema standardizzato di quantificazione risulta tuttavia necessario per assicurare ripetibilità tra i dati in sessioni diverse, ed utilizzando macchinari e protocolli di marcatura differenti. L'espressione degli antigeni comuni potrebbe inoltre essere utile per l'analisi maturazionale delle cellule linfoidi in assenza di altri marcatori utilizzabili nella specie canina.

BIBLIOGRAFIA

1. Comazzi S., Gelain M.E., Giordano A., Ponti W. (2004) CYTOMETRIC PATTERNS OF BLOOD FROM DOGS WITH NEOPLASTIC AND NON-NEOPLASTIC DISEASES USING CD18/CD45 DOUBLE LABELLING. *Veterinary Clinical Pathology*, 33, 261
2. Grindem CB. (1996) BLOOD CELL MARKERS. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.*;26:1043-1064.
3. Borowitz MJ, Bray R, Gascoyne R, et al. (1997) U.S.-CANADIAN CONSENSUS RECOMMENDATIONS ON THE IMMUNOPHENOTYPIC ANALYSIS OF HEMATOLOGIC NEOPLASIA BY FLOW CYTOMETRY: DATA ANALYSIS AND INTERPRETATION. *Cytometry*. 30:236-244.
4. Vernau W, Moore PF. (1999) AN IMMUNOPHENOTYPING STUDY OF CANINE LEUKEMIAS AND PRELIMINARY ASSESMENT OF CLONALITY BY POLYMERASE CHAIN REACTION. *Vet Immunol Immunopathol*. 69:145-164.

GAMMOPATIA BICLONALE IN UN GATTO CON PLASMACITOMA EXTRAMIDOLLARE EPATOSPLENICO

Walter Bertazzolo*, Davide Zuliani**, Paola Roccabianca***

*Pronto Soccorso Veterinario, via Defendente, 29/a - 26900 Lodi

**Clinica Veterinaria Tibaldi, viale Tibaldi, 66 - 20136 Milano

***Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria - Sezione di Anatomia Patologica e Patologia Aviare - Università degli Studi di Milano - Via Celoria, 10 20133 Milano

Un gatto europeo femmina di 15 anni, venne condotta alla visita clinica a causa di una progressiva perdita di peso corporeo, anoressia e abbattimento. Disidratazione (5-7%), mucose pallide, un soffio sistolico 2/6 ed splenomegalia erano rilevati all'esame clinico. L'esame ecografico addominale mostrava splenomegalia e diffusa ipoecogenicità splenica ed epatica. L'esame citologicodi fegato e milza mostrava la presenza di numerose cellule rotonde di aspetto plasmocitoide, spesso bi-multi nucleate e con marcati criteri di atipia citologica.

L'esame emocromocitometrico mostrava una modesta anemia non rigenerativa normocitica normocromica (RBC $4,73 \times 10^6/\mu\text{l}$, intervallo di riferimento (RI) $5-10 \times 10^6/\mu\text{l}$; HCT 21,2, RI 30-45; HB 6,7 g/dl, RI 8-15 g/dl), mentre la biochimica clinica evidenziava una modesta iperazotemia (creatinina 2,5 mg/dl, RI 0,5-1,5 mg/dl) ed una iperproteinemia (proteine totali 10,1 g/dl, RI 5,8-8 g/dl) con ipoalbuminemia (albumine 2 g/dl, RI 2,5-4 g/dl) ed iperglobulinemia (globuline 8,1 g/dl, RI 2,8-5,5 g/dl). L'elettroforesi sierica mostrava due picchi di aspetto monoclonale nella regione delle gammaglobuline. Tali globuline venivano identificate come IgG mediante immunoprecipitazione su gel di agarosio e mediante immunocitochimica. L'esame citologico di un campione midollare omerale evidenziava la presenza di occasionali plasmacellule atipiche in percentuale limitata (<3% delle cellule nucleate totali). Dopo eutanasia e necropsia e l'esame istologico confermava la presenza di un plasmacitoma extramidollare epatosplenico.

Parole chiave: gatto, plasmacitoma, gammopatia, biclonale.

BICLONAL GAMMOPATHY IN A CAT WITH EXTRAMEDULLARY HEPATOSPLENIC PLASMACYTOMA.

A 15-year-old female domestic shorthaired cat, was presented because of progressive weight loss, anorexia and depression. Dehydration (5-7%), pale mucous membranes, a 2/6 heart murmur and splenomegaly were found on clinical examination. Abdominal ultrasonography showed splenomegaly with hypoechoic splenic and hepatic parenchyma. Cytology from liver and spleen showed numerous plasmacytoid round cells showing severe cytologic atypia. CBC showed a mild non regenerative normocytic normochromic anemia (RBC $4,73 \times 10^6/\mu\text{l}$, reference interval (RI) $5-10 \times 10^6/\mu\text{l}$; HCT 21,2, RI 30-45; HB 6,7 g/dl, RI 8-15 g/dl), whereas mild hypercreatininemia (creatinine 2,5 mg/dl, RI 0,5-1,5 mg/dl) and hyperproteinemia (total protein 10,1 g/dl, RI 5,8-8 g/dl) with hypoalbuminemia (albumin 2 g/dl, RI 2,5-4 g/dl) and hyperglobulinemia (globulin 8,1 g/dl, RI 2,8-5,5 g/dl) were found on clinical chemistry. Serum electrophoresis showed two monoclonal peaks in the gamma region. These globulins were characterized as IgG based on agar gel immunoprecipitation and immunocytochemistry. Bone marrow cytology showed less than 3% atypical plasma cells. Hepatosplenic plasmacytoma was confirmed by necropsy and histopathology.

Key words: cat, plasmacytoma, gammopathy, biclonal.

**MESSA A PUNTO DI UN METODO DI RT-PCR SEMIQUANTITATIVO PER LA VALUTAZIONE
DELL'ESPRESSIONE DI CITOCHINE FELINE SU SANGUE INTERO**

Gelain Maria Elena, Marina Meli*, Isabella Taboni**, Vanessa Pocacqua, Saverio Paltrinieri

*Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Università di Milano; *Center for Clinical Studies, Vetsuisse Faculty, University of Zurich, Switzerland*

*** Biodiversity S.r.l., Brescia*

L'espressione di citochine è spesso analizzata su leucociti isolati, mediante costose e complesse PCR quantitative. Scopo del lavoro è stato mettere a punto, su sangue intero, una RT-PCR semiquantitativa per determinare l'espressione di citochine feline, stabilirne riproducibilità e utilità nel comparare risultati ottenuti in sessioni di test differenti e in gatti con diverso tipo d'infezione da coronavirus felino (FCoV). Sono stati analizzati 3 gatti SPF, 4 FCoV-positivi asintomatici (campionati mensilmente) e 3 con peritonite infettiva felina (FIP), patologia indotta da FCoV. Eventuali variazioni nell'efficienza di estrazione e retrotrascrizione sono state normalizzate scegliendo diluizioni di cDNA caratterizzate da bande di GAPDH di simile intensità. L'intensità delle bande di amplificazione delle citochine è stata valutata mediante analisi d'immagine e rapportata a quella del DNA mass ladder incluso in ogni gel. La ripetibilità è stata valutata riamplicando più volte i cDNA e calcolando il coefficiente di variazione (CV).

Il CV è risultato inferiore a 10% in 8/12 casi (67%), tra 10 e 15% in 2 casi (17%) e superiore a 15% in soli 2 casi (17%). Il confronto tra gruppi non ha rivelato differenze significative nella quantità di citochine. Mentre i gatti SPF esprimevano solo IL1 β , i gatti FCoV asintomatici mostravano fluttuazioni di IL1 β , IL4, IL12_{p40} e, in minor misura, di IFN γ , TNF α , IL10, IL6, con livelli più alti di IL1 β e IFN γ in occasione di casi di FIP nell'allevamento. Il quadro citochinico dei gatti con FIP è risultato invece molto variabile.

Tale metodo è pratico, economico, ripetibile e riesce ad identificare variazioni nell'espressione di citochine *in vivo*, il cui significato nelle infezioni da FCoV va verificato su un'ampia casistica.

Parole chiave: Citochine feline, RT-PCR semiquantitativa, sangue intero, FCoV.

**ESTABLISHMENT OF A SEMIQUANTITATIVE RT-PCR ANALYSIS FOR EVALUATING CYTOKINES
EXPRESSION IN FELINE WHOLE BLOOD**

The aims of this study were to develop a semiquantitative RT-PCR for determination of feline cytokines using RNA extracted from whole blood and to evaluate the repeatability of the method and its ability to compare results obtained in different sessions of tests or in cats with different feline coronavirus (FCoV) status. 3 SPF cats, 4 cats with non symptomatic FCoV infection (repeatedly sampled once a month) and 3 with Feline Infectious Peritonitis (FIP), the clinical form of FCoV infection, were examined.

The variability among samples was normalized by selecting cDNA dilutions which had GAPDH bands of similar intensity. After cytokine amplification, the intensity of each band was measured by image analysis and compared with that of the mass ladder included in each gel. To assess repeatability, cDNAs were repeatedly amplified and the coefficient of variation (CV) was calculated.

The CV was lower than 10% in 8/12 cases (67%), between 10 and 15% in 2 cases (17%) and higher than 15% in only 2 cases (17%). Group comparison did not show significantly different cytokine levels. SPF cats expressed only IL1 β . In non-symptomatic FCoV cats IL1 β , IL4, IL12_{p40} and, to a lesser extent, IFN γ , TNF α , IL10, IL6, fluctuated over the time. Levels of IL1 β and IFN γ were higher when a case of FIP was recorded in the cattery. Cytokine patterns of FIP cats were very variable.

The method is practical, cheap, repeatable, and able to reveal *in vivo* fluctuations of cytokine expression, whose role in feline coronaviruses needs to be evaluated on a larger caseload.

Key words: feline cytokines, semiquantitative RT-PCR, whole blood, FCoV.

INTRODUZIONE

Le citochine svolgono un ruolo cruciale nella differenziazione, proliferazione e interazione cellulare¹. Per tale motivo sono sempre più richieste metodiche in grado di valutare variazioni della loro espressione. In particolare, la quantificazione della produzione di citochine da parte dei leucociti del sangue periferico sembra poter dare una stima dello stato immunitario "periferico"². A questo scopo tecniche molecolari sono i metodi più sensibili anche se alcune, come la real time PCR, richiedono personale specializzato e attrezzature costose. Le tecniche semiquantitative, sebbene non diano una precisa quantificazione dell'espressione genica, sono più pratiche e hanno dimostrato un'elevata attendibilità e riproducibilità. Diversi studi, molti dei quali condotti *in vitro*^{3,4}, descrivono il ruolo delle principali citochine in molte patologie feline^{5, 6}. Tuttavia con questo approccio viene meno l'interazione cellulare che, *in vivo*, regola la produzione finale di citochine. Inoltre, le metodiche d'isolamento possono influenzare i livelli di mRNA^{2, 7}. L'utilizzo di sangue intero può essere considerato un metodo alternativo che riduce costi e tempi per la preparazione del campione e permette di ottenere dati che riflettono in modo più accurato il profilo citochinico. Pochi sono gli studi condotti in medicina veterinaria con questa metodica^{7, 8}, nessuno applicato al gatto. Scopo del lavoro è stato quello di mettere a punto una RT-PCR semiquantitativa per la valutazione dell'espressione nel gatto delle principali citochine (IL1 β , IL6, TNF- α , IL12_{p40}, IL10, IL4, IFN- γ) utilizzando mRNA estratto da sangue intero e valutarne la ripetibilità. Inoltre, per verificare una possibile applicazione pratica, abbiamo valutato se questo metodo era in grado di rilevare variazione del quadro citochinico in gatti con differenti livelli di infezione da Coronavirus Felino (FCoV) e in gatti specific pathogen free (SPF) poiché i dati pubblicati sul profilo citochinico in gatti FCoV-sintomatici sono controversi^{9, 10} mentre animali FCoV-positivi non sintomatici presentano variazioni clinico-patologiche correlate ad uno stato di premunizione immunitaria indotta da citochine^{11, 12}.

MATERIALI E METODI

Sono stati analizzati 24 campioni di sangue di 10 gatti suddivisi in 3 gruppi.

I gruppo: 4 gatti clinicamente sani provenienti da un allevamento endemico per FCoV, sui quali sono stati effettuati prelievi mensili di sangue e feci.

II gruppo: 3 gatti affetti da peritonite infettiva felina (FIP),

III gruppo: 3 gatti SPF stabulati all'Università di Zurigo.

Su ogni campione è stato eseguito l'esame emocromocitometrico e formulaleucocitaria. Il plasma è stato utilizzato per valutare il titolo anticorpale anti-FCoV, mediante immunofluorescenza indiretta e sulle feci è stata eseguita un RT-PCR per la ricerca dell'mRNA virale utilizzando per l'estrazione un kit commerciale (QIAamp Viral RNA mini Kit, Qiagen), cui è seguita la retrotrascrizione. Per l'estrazione di RNA con kit commerciale (QIAamp® RNABLOOD, Qiagen), è stato utilizzato un volume di sangue tale da avere 3×10^6 leucociti totali. Per evitare contaminazione da DNA genomico, durante l'estrazione è stato eseguito un trattamento di DNasi (RNase-Free DNase, Quiagen). Il materiale estratto è stato retrotrascritto con oligodT e con kit commerciale (Ready-To-Go™ You-Prime First-Strand Beads, Amersham Biosciences). Variazioni nell'efficienza di estrazione e retrotrascrizione sono state normalizzate valutando l'espressione del gene housekeeping GAPDH tramite analisi dell'immagine digitalizzata del gel di PCR. Sono state eseguite PCR per ciascuna citochina utilizzando diluizioni di cDNA caratterizzate da bande di GAPDH di simile intensità. L'intensità delle bande di amplificazione delle citochine è stata valutata mediante analisi d'immagine e confrontata a quella della banda da 500bp del DNA mass ladder incluso in ogni gel. I valori sono stati espressi come percentuale dell'intensità media del marcatore per ridurre ogni possibile variazione legata alla processazione del gel. La ripetibilità è stata valutata sul segnale dell'IL-1 β , riamplicando più volte cDNA di differenti prelievi e calcolando il coefficiente di variazione (CV). Il possibile legame tra quadro citochinico e FCoV-status è stato analizzato valutando le differenze tra gruppi, tra i diversi prelievi dei gatti del I gruppo e tra i gatti del gruppo I. Si è inoltre valutata la correlazione tra espressione citochinica, positività sierologica al virus e formula leucocitaria.

RISULTATI

L'analisi ripetuta dell'espressione dell'IL-1 β (Tab.1) ha dimostrato, nella maggior parte dei casi, un CV inferiore al 10% (8/12) e in soli due casi superiore al 20%. In uno di questi ultimi casi, l'elevato CV era dovuto ad una sola analisi il cui valore si discostava dalle altre quattro che, al contrario, presentavano valori simili. E' stato possibile identificare tutte le citochine in almeno un campione (Tab.2), sebbene solo IL-1 β fosse espressa in tutti i prelievi. Nella maggior parte dei campioni sono state identificate IL-4, IL-12, mentre IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-10 sono state raramente rilevate. Non erano presenti differenze statisticamente significative nell'espressione citochinica tra gruppi (FCoV, FIP, SPF), né tra i gatti del gruppo I e tra gatti eliminatori di FCoV e non. E' stato invece possibile identificare un aumento significativo dell'espressione di IL-1 β e IFN- γ al quinto prelievo dei gatti del primo gruppo, in corrispondenza di casi di FIP conclamata nell'allevamento. Non erano presenti correlazioni tra quadro citochinico, titolo anticorpale anti-FCoV e formula leucocitaria.

DISCUSSIONE

Lo studio delle variazioni nella produzione delle citochine è importante per investigare la patogenesi e l'evoluzione di molte patologie immuno-mediate e infiammatorie. Per questo fine, l'uso del sangue intero come campione su cui valutare l'espressione genica può essere considerato un metodo pratico che riduce costi e tempi rispetto alla tecniche di isolamento cellulare normalmente usate. Permette inoltre di lavorare con una minor quantità di materiale e una più facile standardizzazione del numero di cellule di partenza. Il protocollo usato in questo studio, con la normalizzazione basata sull'espressione del GAPDH valutata con uno specifico software, metodo spesso usato per l'analisi semiquantitativa di immagini digitalizzate^{5, 6, 8} e l'espressione dei valori in funzione di un calibratore interno, ha permesso di comparare i risultati ottenuti da soggetti, prelievi e sessioni di lavoro diverse. E' stato inoltre possibile identificare quadri citochinici diversi in animali che presentavano diversi livelli di infezione da FCoV. I gatti SPF esprimevano solo IL1 β e i gatti FIP un quadro molto variabile, i gatti FCoV asintomatici mostravano fluttuazioni di IL1 β , IL4, IL12_{p40} e, in minor misura, di IFN γ , TNF α , IL10, IL6, con livelli più alti di IL1 β e IFN γ in occasione di casi di FIP conclamata nell'allevamento.

CONCLUSIONE

La procedura suggerita in questo lavoro è un metodo rapido ed economico per ottenere dati semiquantitativi dell'espressione di citochine. Questa metodica potrebbe essere applicata come strumento diagnostico di routine nella valutazione di alterazioni dell'espressione genica.

In questo caso inoltre si avrebbero risultati più rappresentativi della situazione dell'organismo che non utilizzando metodiche in vitro, necessarie, per studiare le interferenze virali o di molecole immunomodulatrici sulle popolazioni leucocitarie.

Il confronto tra i risultati dei gatti SPF con quelli dei gatti FCoV positivi rivela diversi quadri citochinici, suggerendo un impiego clinico di questa metodica. Il ridotto numero di campioni ci permette solo di ipotizzare che alcune delle alterazioni potrebbero avere un significato protettivo nei confronti dell'infezione da FCoV, anche se è necessario ampliare il campionamento per poter confermare questa ipotesi e per poter delineare un quadro citochinico da utilizzare nella diagnosi di FIP o nella predisposizione a sviluppare la patologia.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Balkwill F.R. and Burke F. (1989) Cytokine network. *Immunol Today* 10 299-304
- [2] Stordeur P. et al. (2002) Analysis of spontaneous mRNA cytokine production in peripheral blood. *J Immunol Methods* 261:195-197
- [3] Kipar A. et al. (2001) Cytokine mRNA levels in isolated feline monocytes, *Vet immunol. Immunopathol*, 78:305-315
- [4] Leutenegger C.M. et al. (1999) Quantitative real-time PCR for the measurement of feline cytokine mRNA. *Vet Immunol Immunopathol* 71, 291-305.
- [5] DeLaurier A. et al. (2002) Cytokine expression in feline osteoclastic resorptive lesions. *J Comp Pathol* 127, 169-177.
- [6] Harley R. et al. (1999) Cytokine mRNA expression in lesions in cats with chronic gingivostomatitis. *Clinical Diagn Lab Immunol* 6, 471-478
- [7] Barth S. et al. (2000) In vitro cytokine mRNA expression in normal human peripheral blood mononuclear cells. *Inflamm Res* 49:266-247
- [8] Yancy H et al. (2001) Differential cytokine mRNA expression in swine whole blood and peripheral blood mononuclear cell cultures. *Vet Immunol Immunopathol* 79:41-52
- [9] Dean G.A. et al. (2003) In vivo cytokine response to experimental feline infectious peritonitis virus infection. *Vet Microbiol* 97, 1-12
- [10] Kiss I. et al. (2004) Disease outcome and cytokine responses in cats immunized with an avirulent feline infectious peritonitis virus (FIPV)-UCD1 and challenge-exposed with virulent FIPV-UCD8. *JFMS* 6:89-97.
- [11] Giordano A et al. (2004) Changes in some acute phase protein and immunoglobulin concentrations in cats affected by feline infectious peritonitis or exposed to feline coronavirus infection. *Vet J.* 167:38-44
- [12] Paltrinieri S et al. (2003) Shifts in circulating lymphocyte subsets in cats with feline infectious peritonitis (FIP): pathogenic role and diagnostic relevance. *Vet Immunol Immunopathol* 96:141-148

GATTO N°	PRELIEVO N°	PROVA 2	PROVA 3	PROVA 4	PROVA 5	PROVA 6	PROVA 7	PROVA 8	MEDIA	DS	CV
A (FcoV)	2	68,8				58,6		65,5	64,3	5,2	8,1
	3		85,8				89,3		87,5	2,5	2,9
	4			85,2				94,6	89,9	6,7	7,4
B (FcoV)	5				91,4			92,6	92,0	0,8	0,9
	2	47,6				53,2			50,4	4,0	7,9
	3		68,8					83,3	76,0	10,2	13,5
C (FcoV)	4				80,9		72,1		76,5	6,2	8,1
	2	76,8				79,9			78,4	2,2	2,9
	3			39,8			55,3		47,6	11,0	23,1
D (FcoV)	2	46,1				54,3			50,2	5,8	11,6
	3		74,8				77,4		76,1	1,8	2,4
H (SPF)	3	33,4	56,2		65,0	55,2		57,3	53,4	11,8	22,2

Tabella 1: Schema dei prelievi nei quali è stata ripetuta l'analisi per IL-1. Sulle analisi ripetute sono state calcolate la media, la deviazione standard (DS) e il coefficiente di variazione (CV).

gatto ID	prelievo n°	IL1	IL4	IL6	IL10	IL12	IFN	TNF
A FcoV	1	63.1	41.3	0,0	0,0	55.3	0,0	0,0
	2	64.3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	3	87.5	51.1	50.1	19.7	72.4	8.3	61.1
	4	89.9	32.0	0,0	0,0	52.4	21.4	0,0
	5	92.0	39.7	0,0	0,0	72.5	26.4	62.3
Gt A Media ± DS		79.4 ± 14.4	32.8 ± 19.6	10.0 ± 22.4	3.9 ± 8.8	50.5 ± 29.7	11.2 ± 12.2	24.7 ± 33.8
B FcoV	1	40.1	0,0	0,0	0,0	61.5	0,0	0,0
	2	53.2	38.2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	3	76.0	80.6	0,0	0,0	48.2	0,0	0,0
	5	76.5	42.3	0,0	0,0	0,0	23.2	0,0
	Gt B media ± DS		61.5 ± 17.9	40.3 ± 32.9	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	27.4 ± 32.1	5.8 ± 11.6
C FcoV	1	56.3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	2	80.0	36.0	0,0	53.2	0,0	31.6	0,0
	4	47.5	0,0	0,0	0,0	49.6	0,0	0,0
	5	93.8	50.4	41.7	0,0	82.0	27.3	0,0
	Gt C media ± DS		69.4 ± 21.3	21.6 ± 25.6	10.4 ± 20.9	13.3 ± 26.6	32.9 ± 40.2	14.7 ± 17.1
D FcoV	1	31.7	48.4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	2	54.3	0,0	0,0	58.2	0,0	0,0	0,0
	3	76.1	24.0	0,0	0,0	42.7	0,0	0,0
	4	71.6	40.8	0,0	0,0	52.8	0,0	0,0
	5	93.0	0,0	0,0	0,0	90.0	29.1	61.6
Gt D media ± DS		65.3 ± 23.3	22.6 ± 22.5	0.0 ± 0.0	11.6 ± 26.0	37.1 ± 38.2	5.8 ± 13.0	12.3 ± 27.5
Gruppo I media ± DS		69.3 ± 19.0	29.2 ± 24.0	5.1 ± 14.9	7.3 ± 18.2	37.7 ± 33.1	9.3 ± 12.8	10.3 ± 23.6
E	FIP	87.1	20.4	0,0	0,0	78.7	7.4	65.7
F	FIP	20.8	0,0	27.2	0,0	0,0	0,0	0,0
G	FIP	34.0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Gruppo II, media ± DS		47.3 ± 35.1	6.8 ± 11.8	9.1 ± 15.7	0.0 ± 0.0	26.2 ± 45.5	2.5 ± 4.3	21.9 ± 37.9
H	SPF	53.4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
I	SPF	44.2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	51.4
L	SPF	55.9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Gruoppo III, media ± DS		51.2 ± 6.2	0.0 ± 0.0	17.1 ± 29.7				

Tabella 2: espressione citochinica espressa come percentuale dell'intensità della banda da 500 bp del marcatore di peso molecolare.

STUDIO CITOFUORIMETRICO SULLA SOVRA- E SOTTO-ESPRESSIONE DEGLI ANTIGENI CD18 E CD45 IN NEOPLASIE LINFODI CANINE CON COINVOLGIMENTO EMATICO

Comazzi Stefano, Gelain Maria Elena

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

Gli antigeni CD18 e CD45 sono presenti sulla membrana di tutti i leucociti con differente espressione tra le varie popolazioni cellulari. L'integrina CD18 è presente a più elevata espressione su granulociti e monociti e risulta coinvolta nel meccanismo di adesione dei leucociti ematici. La glicoproteina CD45 risulta al contrario maggiormente espressa sulla membrana dei linfociti e dei monociti e risulta coinvolta nel meccanismo di attivazione cellulare. La differente espressione quantitativa dei due antigeni può essere utilizzata per identificare sottopopolazioni cellulari anche percentualmente poco rappresentate nonché per identificare eventuali sovra o sotto-espressioni in corso di patologie neoplastiche. Scopo del seguente lavoro preliminare è paragonare l'espressione quantitativa di CD18 e CD45 nel sangue di cani con differenti neoplasie linfoidi ed in cani sani. A tal scopo è stata effettuata una doppia marcatura per gli antigeni CD18 e CD45 su 22 cani con neoplasie linfoidi, di differente natura (leucemie linfoidi croniche -CLL- e acute -ALL- e linfomi leucemici) ed immunofenotipo (T, B e null), e su 13 cani sani di controllo ed è stato calcolato l'indice medio di fluorescenza (MFI) inteso come il rapporto tra la fluorescenza media del campione e la fluorescenza aspecifica delle popolazioni linfoidi. Le neoplasie sono state tipizzate in funzione di aspetti clinici, ematologici e dell'immunofenotipo completo in 7 tipi differenti: T-CLL, B-CLL, linfomi T, Linfomi B, T-ALL, B-ALL, null-ALL. In 10 (45%) campioni neoplastici sono state evidenziate sottoespressioni e in 1 soltanto (4,5%) sovraespressioni di almeno uno degli antigeni. In particolare tutte le le B-CLL (2/2) e le null-ALL (2/2) hanno evidenziato sottoespressioni di CD18 e CD45 rispettivamente mentre una sovraespressione di CD18 è stata evidenziata solo in corso di T-CLL (1/2). L'evidenziazione di sotto o sovra-espressioni degli antigeni comuni può pertanto essere utile per distinguere neoplasie linfoidi con coinvolgimento ematico da forme reattive.

Parole chiave: cane, leucemia linfoide, CD18, CD45, citofluorimetria.

FLOW CYTOMETRIC STUDY ON DOWN OR UP-EXPRESSION OF CD18 AND CD45 IN CANINE LYMPHOID NEOPLASMS WITH BLOOD INVOLVEMENT.

Common antigens CD18 and CD45 are expressed on blood leukocytes at a different extent. CD18 integrin is highly expressed on granulocytes and monocytes and CD45 is higher on lymphocytes and monocytes. This could be useful to identify also cell subsets present at low percentage and to identify leukocyte down- or up-expression in neoplasia. Aim of this preliminary work is to compare the mean fluorescence index of CD18 and CD45 in blood from 22 dogs with different lymphoid neoplasms (chronic -CLL- or acute -ALL- lymphoid leukemias and leukemic lymphomas) of different subsets (T, B or null) with those of 13 healthy dogs. 7 different neoplasms were analyzed: T-CLL, B-CLL, linfomi T, Linfomi B, T-ALL, B-ALL, null-ALL. In 10 (45%) neoplastic samples down-expression and only in one up-expression of at least one antigen were found. In particular all B-CLL (2/2) and null-ALL (2/2) showed down-expression of CD18 and CD45 respectively while up-expression was found only in T-CLL (1/2). The expression of common antigen could be useful to distinguish lymphoid neoplasms and reactive forms.

Key words: dog, lymphoid leukemia, CD18, CD45, flow cytometry.

EFFETTI IN VITRO DELL'IPERGLICEMIA E DELL'ACIDO ASCORBICO SULLA CONCENTRAZIONE DI SORBITOLO IN ERITROCITI DI CANE

Spagnolo Valentina, Comazzi Stefano, Rivolta Simona

Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria (DIPAV) – Università degli Studi di Milano

Il diabete mellito (DM) è un disordine metabolico comune nel cane. Nell'uomo e nel cane diabetico sono state descritte diverse anomalie a carico del metabolismo eritrocitario, che risente direttamente dell'iperlicemia e della chetoacidosi, con gravi effetti sull'emivita e sulla capacità di trasportare O₂ ai tessuti. L'eritrocita, per la semplicità del suo metabolismo, è un modello ideale per studiare la patogenesi delle complicanze diabetiche osservabili nei tessuti in cui l'ingresso del glucosio non dipende dall'insulina (occhio, rene e nervo).

Sugli eritrociti isolati da 5 cani sani sono stati testati *in vitro* gli effetti diretti e a breve termine dell'iperlicemia e della chetoacidosi. I campioni sono stati incubati in diverse condizioni, simulando le possibili complicanze diabetiche (iperlicemia lieve, grave, e grave associata a chetoacidosi), in presenza ed in assenza di acido ascorbico (AA), quale inibitore dell'aldoso reduttasi, enzima che converte il glucosio in sorbitolo. Sono state valutate le variazioni della concentrazione intraeritrocitaria di sorbitolo, prodotto dall'attivazione della via dei polioli, e dei valori di volume corpuscolare medio (MCV), quale indice di rigonfiamento cellulare legato all'accumulo di composti osmoticamente attivi, come il sorbitolo.

I maggiori livelli di sorbitolo osservati in caso di grave iperlicemia, con e senza chetoacidosi, confermano l'attivazione della via dei polioli per l'eccesso di glucosio. Non sono state osservate differenze di sorbitolo tra i campioni incubati con e senza AA. L'aumento di MCV in caso di iperlicemia con chetoacidosi, sia con che senza AA, sembra legato al sorbitolo e allo stress ossidativo, quindi gli effetti ossidanti dell'AA prevarrebbero su quelli antiossidanti.

La tecnica adottata ha permesso di ricreare *in vitro* varie condizioni osservabili in corso di DM a prescindere dalla variabilità individuale, legata ai diversi livelli di compensazione, che si osserverebbe lavorando *in vivo* su campioni di soggetti diabetici. L'analisi delle alterazioni eritrocitarie riscontrate contribuisce alla comprensione dei meccanismi patogenetici che stanno alla base di complicanze diabetiche, alcune delle quali molto comuni nel cane, come la cataratta. Ulteriori indagini permetterebbero di approfondire altri meccanismi patogenetici alla base delle complicanze da DM, quali la glicosilazione proteica, e di fornire indicazioni sul possibile utilizzo dell'AA nella prevenzione di tali fenomeni.

Parole chiave: cane, eritrociti, sorbitolo, MCV, acido ascorbico.

IN VITRO EFFECTS OF HYPERGLYCEMIA AND ASCORBIC ACID ON SORBITOL CONCENTRATION IN CANINE ERYTHROCYTES.

Erythrocytes isolated from 5 healthy dogs were incubated under different conditions, simulating the main complications of diabetes mellitus, with and without ascorbic acid (AA). The highest sorbitol concentration was observed under severe hyperglycemic conditions, both with and without ketoacidosis, while no differences were observed between samples incubated with and without AA. An increased MCV was detectable in the case of simultaneous hyperglycemic and ketoacidotic conditions, both with and without AA. Sorbitol increase suggests the activation of the polyol pathway, due to hyperglycemia. MCV increase suggests a cellular swelling, due to the presence of the osmotically active sorbitol. Moreover AA seemed to have no effects as antioxidant agent.

The erythrocytic changes may contribute to elucidate some pathogenetic aspects of diabetic complications, that could be applied also to other tissues (eye, kidney and nerve) whose glucose metabolism is independent from insulin.

Key words: dog, erythrocyte, sorbitol, MCV, ascorbic acid.

INTRODUZIONE

Il diabete mellito (DM) è un disordine metabolico molto comune nel cane, nel quale l'incidenza risulta essere pari all'1,52%. Nel corso della malattia si possono sviluppare numerose complicanze, quali chetoacidosi, cataratta, retinopatia, nefropatia, neuropatia, nonché complicanze ematologiche. La cataratta diabetica rappresenta la più importante e la più frequente lesione oculare associata al DM nel cane, specie in cui, a differenza di quanto avviene nell'uomo, insorge precocemente con un processo irreversibile e a rapida evoluzione. Solo mediante un adeguato

controllo della glicemia è possibile rallentarne o bloccarne lo sviluppo. Nella patogenesi della cataratta è principalmente implicato l'accumulo di composti osmoticamente attivi, quali il sorbitolo, prodotto dalla via dei polioli, in cui il glucosio viene convertito in sorbitolo grazie all'enzima aldoso reduttasi, la cui attività viene stimolata dall'iperglicemia. Le membrane cellulari sono scarsamente permeabili al sorbitolo, che, accumulandosi a livello endocellulare, instaura un gradiente osmotico, con richiamo di quote idriche e rigonfiamento cellulare. A livello oculare il sorbitolo si accumula nelle fibre del cristallino, che vanno incontro a rigonfiamento ed opacizzazione (cataratta). Le principali complicanze diabetiche si verificano nei tessuti insulino-indipendenti, quali occhio, rene e nervi, quindi direttamente esposti all'effetto dell'iperglicemia. Anche i globuli rossi sono cellule insulino-indipendenti. Questo dato, insieme con l'estrema semplicità del loro metabolismo, associata alla facilità del loro isolamento e mantenimento in coltura, rende gli eritrociti un modello ideale per studiare i meccanismi patogenetici che presiedono lo sviluppo della cataratta diabetica.

Con questo lavoro abbiamo scelto di testare "in vitro" gli effetti diretti e a breve termine dell'iperglicemia e della chetoacidosi sulla funzionalità eritrocitaria. Sono state valutate le variazioni della concentrazione intraeritrocitaria di sorbitolo e dei valori di volume corpuscolare medio (MCV) in risposta a differenti condizioni di incubazione. Sono inoltre stati indagati i possibili effetti dell'AA quale inibitore dell'aldoso reduttasi. La scelta di condurre uno studio "in vitro" scaturisce dalla necessità di eliminare l'influenza della variabilità individuale, legata anche al diverso grado di compensazione della malattia, che si avrebbero lavorando invece "in vivo".

MATERIALI E METODI

Il lavoro sperimentale è stato eseguito su campioni ematici prelevati sterilmente da 5 cani senza segni clinici riferibili a patologia, e di età, sesso e razza diversi.

Da ciascun campione gli eritrociti sono stati isolati e posti ad incubare (24 ore a 37°C) in 4 differenti terreni di coltura, volti a simulare rispettivamente condizioni di euglicemia, iperglicemia lieve, iperglicemia grave e iperglicemia grave associata a chetoacidosi. Le 4 condizioni sono state riprodotte sia in presenza che in assenza di AA. Al termine dell'incubazione, la concentrazione di sorbitolo nei vari campioni è stata valutata con metodica fluorimetrica enzimatica (misurazione della fluorescenza del NADH prodotto dalla conversione del sorbitolo in fruttosio mediante l'enzima sorbitolo deidrogenasi). I valori di MCV sono stati ricavati con analizzatore automatico.

RISULTATI

I risultati dell'analisi statistica hanno evidenziato più alte concentrazioni di sorbitolo negli eritrociti incubati in condizioni di iperglicemia, sia associata che non associata a chetoacidosi, rispetto a quelli mantenuti in condizioni di euglicemia. Non sono state rilevate differenze significative tra i campioni incubati con o senza l'aggiunta di AA in nessuna delle differenti condizioni di incubazione. Per quanto riguarda l'MCV, nei campioni incubati in condizioni di iperglicemia associata a chetoacidosi sono stati riscontrati valori significativamente più elevati rispetto a quelli ottenuti nei campioni mantenuti in condizioni di euglicemia, sia in presenza che in assenza di AA.

Contrariamente a quanto visto per il sorbitolo, i valori di MCV sono risultati significativamente superiori nei campioni incubati in presenza di AA rispetto a quelli che ne erano privi.

DISCUSSIONE

Dai risultati ottenuti emerge come già dopo 24 ore di incubazione, in condizioni di grave iperglicemia associata a chetoacidosi, quindi analoghe a quelle osservabili in corso di DM scompensato, siano rilevabili incrementi della concentrazione intraeritrocitaria di sorbitolo.

Tale dato conferma come anche iperglicemie di breve durata possano determinare l'attivazione della via dei polioli e l'accumulo endocellulare di sorbitolo, in accordo con quanto evidenziato in lavori precedenti condotti "in vivo" su cani affetti da patologia spontanea, con diverso grado di compensazione. D'altro canto la cataratta diabetica, contrariamente a quanto si verifica nell'uomo, nel cane appare piuttosto precocemente nel corso della patologia diabetica, e i risultati sembrano confermare come l'aumento della concentrazione di sorbitolo all'origine di tale patologia non richieda un'elevata durata della malattia.

Le concentrazioni di sorbitolo trovate negli eritrociti mantenuti sia in condizioni di euglicemia sia di iperglicemia risultano rispettivamente superiori a quelle riscontrate "in vivo" in soggetti con diabete mellito spontaneo, compensato e non compensato. Non si esclude che "in vivo" possano subentrare dei meccanismi compensatori, che favoriscano una più rapida eliminazione dei polioli dall'eritrocita.

Non sono state riscontrate differenze nella concentrazione di sorbitolo tra i campioni incubati in condizioni di sola iperglicemia grave e quelli in cui la grave iperglicemia era associata a chetoacidosi. Questo sembra dimostrare che la chetoacidosi non eserciti un effetto diretto sulla sintesi di sorbitolo e pertanto presumibilmente sull'insorgenza della cataratta diabetica. Tuttavia non si può escludere che altri meccanismi, quali lo stress ossidativo, possano contribuire al rigonfiamento cellulare che sta alla base dello sviluppo di questa patologia.

Il volume corpuscolare medio non è risultato direttamente correlato alla concentrazione di sorbitolo, ed è risultato statisticamente superiore negli eritrociti incubati in condizioni di iperglicemia associata a chetoacidosi. Sembra pertanto che il suo aumento sia da correlare allo stress ossidativo indotto dall'elevata concentrazione di corpi chetonici.

Abbiamo voluto verificare l'effetto dell'AA, in quanto in medicina umana è segnalato il suo ruolo di inibitore dell'aldoso reductasi. Nel nostro lavoro, invece, l'AA non sembra portare ad una diminuzione della concentrazione intracellulare di sorbitolo, né in condizioni di euglicemia né di iperglicemia. Al contrario, gli effetti dell'AA sembrano essere evidenziabili in un aumento di MCV in tutte le condizioni di incubazione, imputabile probabilmente all'azione ossidante di questa molecola. Questi risultati confermano quanto recentemente evidenziato negli eritrociti di cane, nei quali l'aggiunta di AA ha determinato una significativa deplezione del contenuto di antiossidanti cellulari, come il glutathione ridotto.

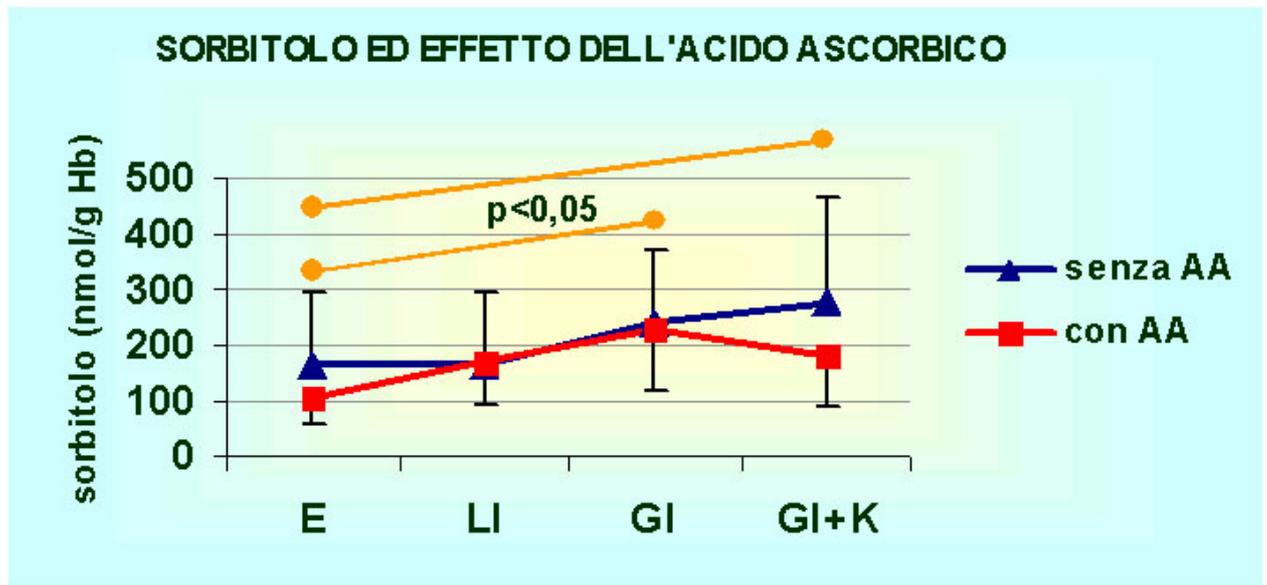
CONCLUSIONE

Dai dati ottenuti in questo lavoro emerge come la tecnica utilizzata permetta di ricreare "in vitro" le diverse condizioni che si osservano in corso di DM, così da poter studiare, a prescindere dalle differenze individuali, le alterazioni a carico della funzionalità eritrocitaria, nonché i meccanismi patogenetici alla base delle complicanze diabetiche, tra le quali la più frequente nella specie canina è sicuramente la cataratta.

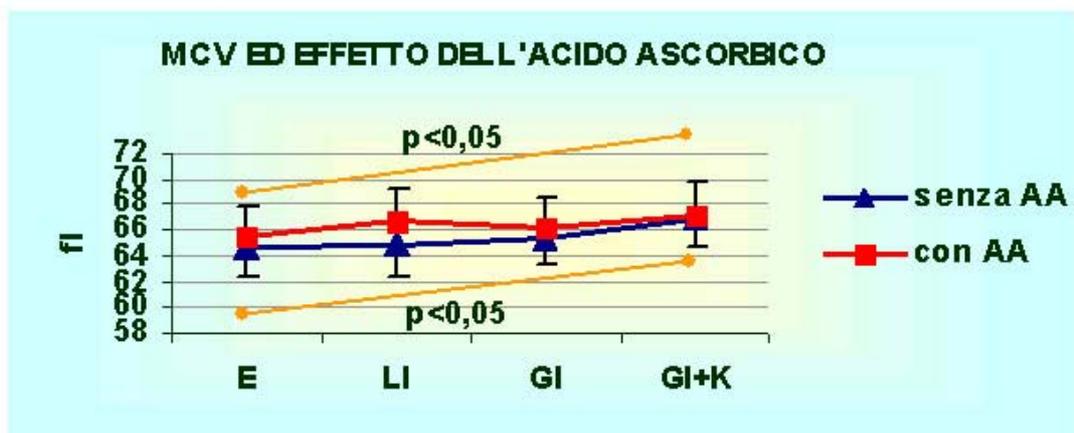
Si ritengono comunque necessarie ulteriori indagini, sfruttando le medesime condizioni di incubazione, per far luce sugli altri meccanismi all'origine delle complicanze del DM, quali i processi di glicosilazione proteica associati alla formazione degli AGE products, oltre anche a valutazioni aggiuntive sulle proprietà dell'AA, o di altre molecole, come inibitori dell'aldoso reductasi, per chiarirne il possibile impiego nella prevenzione di complicanze diabetiche nel cane, quali la cataratta.

BIBLIOGRAFIA

- Basher AWP, Roberts SM. Ocular manifestations of diabetes mellitus: diabetic cataracts in dogs. *Veterinary clinics of North America: small animal practice*. Review. 1995; 25 (3): 661-677.
- Bareford D, Jennings PE, Stone PCW, Baar S, Barnett AH, Stuart J. Effects of hyperglycaemia and sorbitol accumulation on erythrocyte deformability in diabetes mellitus. *Journal of clinical pathology*. 1986; 39 (7): 722-727.
- Brownlee M. Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Annual reviews of medicine*. 1995; 46: 223-234.
- Cayen MN, Hicks DR, Ferdinandi ES, Kraml L, Greselin E, Dvornik D. Metabolic disposition and pharmacokinetics of the aldose reductase inhibitor tolrestat in rats, dogs and monkeys. *Drug metabolism and disposition*. 1985; 13 (4): 412-419.
- Christopher MM. Hematologic complication of diabetes mellitus. *Veterinary clinics of North America: small animal practice*. Review. 1995; 25 (3): 625-637.
- Comazzi S, Bertazzolo W, Bonfanti U, Frugoni M. Sorbitol concentration in erythrocytes from diabetic dogs. *Veterinary clinical pathology*. 2003; 32 (4): 223.
- Comazzi S, Bertazzolo W, Bonfanti U, Spagnolo V, Sartorelli P. Advanced glycation end products, sorbitol and 2,3 diphosphoglycerate in blood from differently compensated diabetic dogs. Inviato per la pubblicazione.
- Comazzi S, Paltrinieri S, Spagnolo V, Sartorelli P. Some aspects of erythrocyte metabolism in insulin-treated diabetic dogs. *Research in veterinary science*. 2002; 72 (1): 23-27.
- Comazzi S, Spagnolo V, Bonfanti U. Erythrocyte changes in canine diabetes mellitus: in vitro effects of hyperglycaemia and chetoacidosis. *Comparative clinical pathology*. 2004; 12: 199-205.
- Cunningham JJ, Mearkle PL, Brown RG. Vitamin C, an aldose reductase inhibitor that normalizes erythrocyte sorbitol in insulin-dependent diabetes mellitus. *Journal of the american college of nutrition*. 1994; 13 (4): 344-350.
- Jain SK, McVie R, Duett J, Herbst JJ. Erythrocyte membrane lipid peroxidation and glycosylated hemoglobin in diabetes. *Diabetes*. 1989; 38 (12): 1539-1543.
- Miyamoto S. Molecular modeling and structure-based drug discovery studies of aldose reductase inhibitors. *Chem-bio informatics journal*. 2002; 2 (3): 74-85.
- Shinoara R, Ohta Y, Yamauchi M, Ishiguro I. Improved enzymatic sorbitol assay in human blood. *Clinica chimica acta*. 1998; 273: 171-184.
- Tsai SC, Burnakis TG. Aldose reductase inhibitors: an update. *The annals of pharmacotherapy*. 1993; 27 (6): 751-754.
- Wang H, Zhang Z, Wen R, Chen J. Experimental and clinical studies on the reduction of erythrocyte sorbitol-glucose ratios by ascorbic acid in diabetes mellitus. *Diabetes research and clinical practice*. 1995; 28: 1-8.



E = euglicemia; LI = lieve iperglicemia; GI = grave iperglicemia;
 GI+K = grave iperglicemia associata a chetoacidosi



E = euglicemia; LI = lieve iperglicemia; GI = grave iperglicemia;
 GI+K = grave iperglicemia associata a chetoacidosi

LEUCEMIA EOSINOFILICA CRONICA IN UN GATTO: ASPETTI CITOLOGICI, CITOCHIMICI E CITOFLUORIMETRICI

Gelain Maria Elena, Antoniazzi Elisa*, Bertazzolo Walter[§], Zaccole Maurizia*, Comazzi Stefano

Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Università degli Studi di Milano.

[§]*Pronto Soccorso Veterinario, via Defendente 29/a, Lodi*

**Clinica Veterinaria "Città di Voghera", Voghera (PV)*

Un gatto maschio comune europeo di 3 anni veniva presentato alla visita clinica dopo 3 giorni di anoressia e depressione. Il proprietario riferiva una progressiva perdita di peso nelle ultime due settimane con occasionali lipotimie. All'esame clinico il gatto si presentava moderatamente disidratato, con mucose pallide e sub-itteriche. Moderata epato-splenomegalia era evidente all'esame radiografico. L'esame emocromocitometrico rivelava una grave anemia non rigenerativa normocitica normocromica, grave trombocitopenia e marcata leucocitosi ($WBC > 100 \times 10^3/\mu L$) con estrema eosinofilia (77% PME).

Gli esami ematochimici evidenziavano unicamente elevati valori di alanin-aminotransferasi. Il gatto risultava FeLV positivo e FIV negativo. Nonostante terapia con prednisone e doxiciclina, le condizioni generali dell'animale peggioravano progressivamente. Dopo 15 giorni dalla prima presentazione persisteva la grave anemia normocitica normocromica non rigenerativa, la trombocitopenia e la marcata leucocitosi ($WBC 139 \times 10^3/\mu L$). La formula leucocitaria evidenziava una marcata eosinofilia (PME $125.1 \times 10^3/\mu L$), la presenza di granulociti eosinofili maturi con nucleo ipersegmentato o ad anello, granulociti eosinofili a banda e forme più immature (metamielociti e mielociti).

All'esame citologico tutti gli organi risultavano massivamente infiltrati da granulociti eosinofili maturi, metamielociti, mielociti eosinofili e neutrofilii e cellule blastiche non identificabili. Sia il sangue periferico sia il midollo osseo risultavano positivi alle colorazioni citochimiche per fosfatasi alcalina, negativi per mieloperossidasi, cloracetato esterasi e naftil-acetato esterasi. I quadri citofluorimetrici di sangue e midollo osseo erano sovrapponibili: il 90% delle cellule esprimevano l'antigene CD11b e il 74% erano caratterizzate dalla espressione atipica di positività a CD14.

La necropsia rivelava cachessia, ittero, epato-splenomegalia e linfadenomegalia dei linfonodi meseraici.

L'esame istologico evidenziava una massiva infiltrazione eosinofila splenica e linfonodale meseraica ed una moderata infiltrazione eosinofila epatica.

Le diagnosi differenziali per l'estrema eosinofilia nel gatto contemplano la leucemia eosinofila cronica e la sindrome ipereosinofila. Nel caso in esame, la marcata eosinofilia con la presenza di forme immature, l'infiltrazione delle medesime cellule nel midollo, fegato, milza e linfonodi, oltre al quadro citochimico e citofluorimetrico hanno permesso di confermare la diagnosi di leucemia eosinofila cronica.

Parole chiave: leucemia eosinofila, gatto, citofluorimetria, FeLV.

CHRONIC EOSINOPHILIC LEUKEMIA IN A CAT: CYTOLOGICAL, CYTOCHEMICAL AND IMMUNOPHENOTYPICAL FEATURES

A 3-year-old male domestic shorthaired cat FeLV-positive was presented for evaluation with a three-day history of anorexia and depression. Complete blood cell count revealed a severe normocytic, normochromic, non-regenerative anemia, a severe thrombocytopenia, a marked leukocytosis with extreme eosinophilia. Examination of blood, bone marrow, liver, lymph nodes and spleen smears revealed the presence of immature eosinophils. Cytochemistry stained positively for alkaline phosphatase and negatively for myeloperoxidase, chloroacetate esterase and α -naphthyl acetate esterase. Flow cytometry of neoplastic cells showed a positivity for CD11b and CD14. Histopathology showed a multiple organ infiltration by eosinophilic granulocytes. These findings were consistent with chronic eosinophilic leukemia.

Key words: eosinophilic leukemia, cat, flow cytometry, FeLV.

INTRODUZIONE

La leucemia eosinofila (LE) è una patologia estremamente rare nel gatto caratterizzata da una marcata eosinofilia, dalla presenza di forme immature in circolo e dall'aumento dei precursori eosinofili nel midollo osseo. Sono inoltre presenti infiltrati di eosinofili immaturi in molti organi, soprattutto milza, fegato, intestino e linfonodi^{1,2}. Solo due dei

precedenti casi riportati erano positivi a FeLV^{2,3}. La leucemia eosinoflica dovrebbe essere differenziata dalla sindrome ipereosinoflica (HES) che presenta un decorso cronico e nella quale la marcata eosinofilia nel sangue periferico e gli infiltrati tessutali sono dati da forme mature¹.

CASE REPORT

Un gatto maschio comune europeo di 3 anni veniva presentato alla visita clinica dopo 3 giorni di anoressia e depressione. Il proprietario riferiva una progressiva perdita di peso nelle ultime due settimane con occasionali lipotimie. All'esame clinico il gatto si presentava moderatamente disidratato, con mucose pallide e sub-itteriche. All'esame radiografico era evidente moderata epato-splenomegalia. L'esame emocromocitometrico rivelava una grave anemia non rigenerativa normocitica normocromica (RBC $1,63 \times 10^6/\mu\text{L}$, Hct 8,1%), grave trombocitopenia (PLT 11,000/ μL) e marcata leucocitosi (WBC $>100 \times 10^3/\mu\text{L}$) con estrema eosinofilia (77% PME) e con la presenza di forme immature (2%). Gli esami ematochimici evidenziavano unicamente elevati valori di alanin-aminotransferasi (520 UI/L). Il gatto risultava FeLV positivo e FIV negativo. Nonostante terapia con prednisone e doxiciclina, le condizioni generali dell'animale peggioravano progressivamente. Dopo 15 giorni dalla prima presentazione persisteva la grave anemia normocitica normocromica non rigenerativa (RBC $0,64 \times 10^6/\mu\text{L}$, Hct 3,4%, Hgb 2.2 gr/dL, reticolociti 0%), la trombocitopenia (PLT 28,000/ μL) e la marcata leucocitosi (WBC $139 \times 10^3/\mu\text{L}$). La formula leucocitaria evidenziava una marcata eosinofilia (PME $125.1 \times 10^3/\mu\text{L}$), la presenza di granulociti eosinofili maturi con nucleo ipersegmentato o ad anello, granulociti eosinofili a banda e forme più immature (metamielociti e mielociti) (foto 1). L'esame citologico del midollo evidenziava un elevato rapporto mieloide/eritroide (94,6:1) ed un aumento dei precursori eosinofili.

All'esame citologico, tutti gli organi risultavano massivamente infiltrati da granulociti eosinofili maturi, metamielociti, mielociti eosinofili e neutrofili e cellule blastiche non identificabili.

Sia il sangue periferico sia il midollo osseo risultavano positivi alle colorazioni citochimiche per fosfatasi alcalina, negativi per mieloperossidasi (MPX), cloracetato esterasi (CAE) e naftil-acetato esterasi (NAE)(foto 2,3). I quadri citofluorimetrici di sangue e midollo osseo erano sovrapponibili: il 90% delle cellule esprimevano l'antigene CD11b e il 74% erano caratterizzate dalla espressione atipica di positività a CD14 (fig.1).

La necropsia rivelava cachessia, ittero, epato-splenomegalia e linfadenomegalia dei linfonodi meseraici. L'esame istologico evidenziava una massiva infiltrazione eosinoflica splenica (foto 4) e linfonodale meseraica ed una moderata infiltrazione eosinoflica epatica.

DISCUSSIONE

L'ipereosinofilia è definita da un numero assoluto di granulociti eosinofili nel sangue periferico superiore a $1500/\mu\text{L}$. Le cause di eosinofilia nel gatto sono numerose, le più frequenti sono la dermatite allergica da pulci, il granuloma eosinoflico e l'asma bronchiale⁴. I livelli più elevati di eosinofili nel sangue periferico finora riportati, per queste patologie, sono di $46.2 \times 10^3/\mu\text{L}$ per il granuloma e $23 \times 10^3/\mu\text{L}$ per la dermatite allergica. Anche le sindromi paraneoplastiche associate a diversi tumori sono causa di eosinofilia. Ma, ad eccezione delle forme sistemiche di mastocitoma e alcuni carcinomi^{5,6,7}, raramente presentano un numero assoluto di eosinofili che superano i $5000/\mu\text{L}$. Forme di eosinofilia estrema (oltre $50.000/\mu\text{L}$), nel gatto, sono di norma associate a rari disordini come la sindrome ipereosinoflica (HES) e la leucemia eosinoflica (LE)¹. In entrambe sono presenti gli stessi sintomi clinici, spesso legati ad un interessamento dell'apparato gastroenterico, come perdita di peso, anoressia, vomito, diarrea. Gli aspetti clinico-patologici della HES sono una marcato aumento degli eosinofili maturi senza causa apparente, midollo osseo ipercellulare (M:E 10:1)¹ e presenza di infiltrati di eosinofili maturi in vari organi⁸. Entrambe le patologie hanno prognosi infausta, anche se la HES ha un decorso più lungo⁹.

L'andamento acuto, la marcata eosinofilia caratterizzata da eosinofili immaturi, displastici, infiltranti vari organi, hanno invece permesso, nel caso in esame, la diagnosi di leucemia eosinoflica cronica. Come precedentemente riportato², le cellule neoplastiche apparivano scarsamente granulari e in alcuni casi, difficilmente identificabili come granulociti eosinofili. Il quadro citochimico ha escluso la possibilità che si trattassero di granulociti neutrofili, positivi alla mieloperossidasi e alla cloracetato esterasi, e monociti, positivi alla naftil acetato esterasi¹⁰. Al contrario, sono risultati positivi, all'analisi citofluorimetrica, a CD14, antigene espresso da monociti e, debolmente, dai granulociti neutrofili. In medicina umana, è stata evidenziata l'espressione di CD14 in eosinofili dopo attivazione con LPS¹¹, ma non ci sono segnalazioni nel gatto. Una possibile spiegazione può essere data dal fatto che i leucociti coinvolti in questa patologia non sono in realtà considerati da alcuni autori dei veri eosinofili, ma delle forme intermedie (amphophils/heterophil-type leukocytes) da cui la più corretta definizione di leucemia mieloide cronica con eosinofilia¹².

CONCLUSIONI

Per la prima volta è stato documentato il quadro citofluorimetrico di una leucemia eosinoflica in un gatto FeLV positivo. Questo ha permesso di evidenziare, accanto alle alterazioni cliniche, clinico-patologiche e patologiche

sovrapponibili a quelle già riportate nelle precedenti segnalazioni, la presenza di un fenotipo aberrante a carico delle cellule neoplastiche.

BIBLIOGRAFIA:

1. Huibregste B.A. et al.: hypereosinophilic syndrom and eosinophilic leukemia: a comparison of 22 hypereosinophilic cats. *J. Am Anim Hosp Assoc*, 1994, 30:591-599
 2. Swenson C.L. et al.: eosinophilic leukaemia in a cat with naturally acquired feline leukemia virus infection *J. Am Anim Hosp Assoc*, 1993, 29:497-501
 3. Lewis M. G. et al.: retroviral-associated eosinophilic leukemia in the cat. *Am J Vet Res*, 1985, 46:1066-1070
 4. Center S. A. et al.: eosinophilia in the cat: a retrospective study of 312 cases (1975 to 1986). *J. Am Anim Hosp Assoc*, 1990, 26:349-358
 5. Bortnwski H.B. et al.: gastro-intestinal mast cells tumor and eosinophilia in two cats. *J. Am Anim Hosp Assoc*, 1992, 28:271-275
 6. Peaston A.E. et al.: visceral mast cell tumor with eosinophilia and eosinophilic peritoneal and pleural effusion in a cat. *Aust Vet J*, 1994, 71: 215-217
 7. Sellon R.K. et al.: hypereosinophilia associated with transitional cell carcinoma in a cat. *JAVMA*, 1992, 201:591-593
 8. McEwen S.A. et al.: hypereosinophilic syndrom in cats: a report of three cases. *Can J Comp med*, 1985, 49:248-253
 9. Plotnick A.: hypereosinophilic syndrom in a cat. *Feline practice*, 1994, 22:28-31
 10. Raskin R.E. et al.: cytochemistry of normal leukocytes. In *Schalm's veterinary ematology*. Ed. by Feldman B.F. et al., Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2000.
 11. Plotz S.G.: the interaction of human peripheral blood eosinophils with bacterial lipopolysaccharides in CD14 dependent. *Blood*, 2001, 97:235-241
- Finlay D.: eosinophilic leukaemia in the cat: a case report. *Vet Rec*, 1985, 116:567

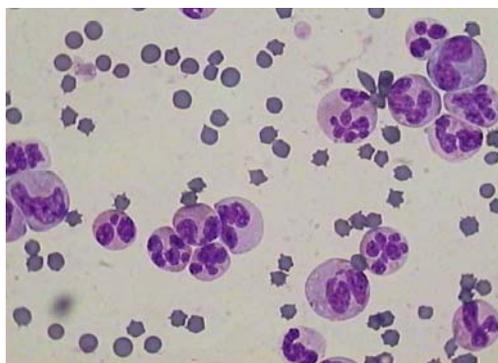


Foto 1: sangue periferico, MGG, 100X

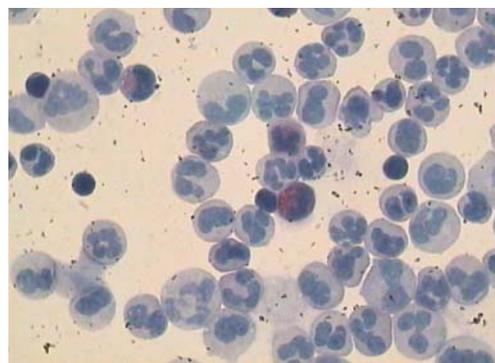


Foto 2: sangue periferico, MPX, 100X

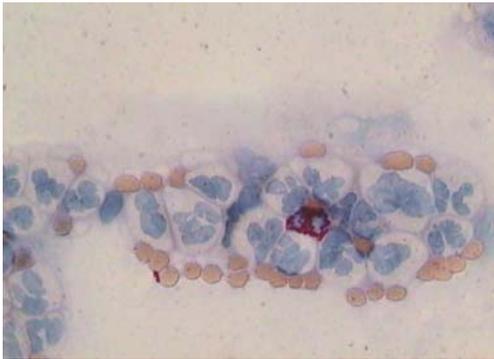


Foto 3: sangue periferico, NAE-CAE, 100X

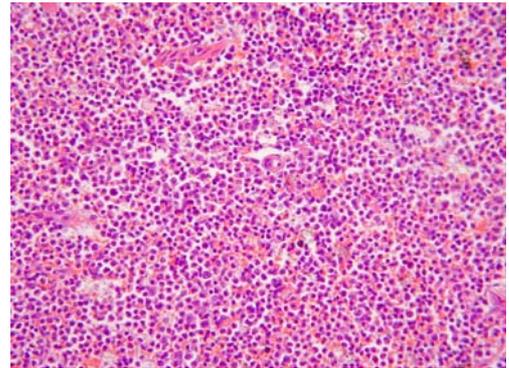


Foto 4: milza, HE, 20X

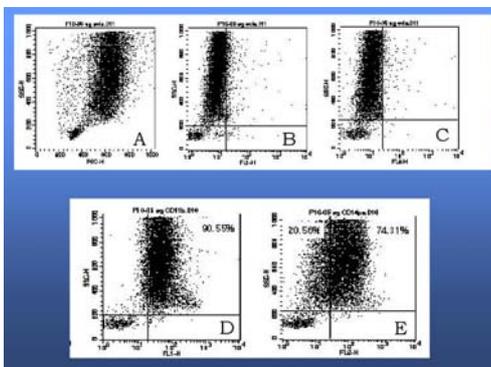


Fig 1: analisi citofluorimetrica. A: forward scatter (FSC)/side scatter (SSC). B e C: controllo isotipico (FL-1, FL-2). D: CD11b (FL-1 Vs SSC). E: CD14 (FL-2 Vs SSC).

LEUCOCITOSI NEUTROFILA ESTREMA IN UN GATTO CON ADENOCARCINOMA MAMMARIO E METASTASI POLMONARI E SPLENICHE

Rossi Silvia*, Giordano Alessia***, Bonfanti Ugo**, Caniatti Mario***

**Clinica Veterinaria Malpensa, Samarate, Varese.*

***Clinica Veterinaria Gran Sasso, Milano*

****Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Università degli Studi di Milano*

Il caso descritto riguarda un gatto comune europeo femmina di 8 anni, riferito al veterinario curante per disoressia ed episodi di tosse che perduravano da circa una settimana. Alla visita clinica è stato possibile rilevare una lieve dispnea ed una piccola neoformazione nodulare a livello di mammella inguinale destra. Eccezzuate le alterazioni descritte, il soggetto appariva in buone condizioni generali. I radiogrammi del torace evidenziavano a livello polmonare un pattern interstiziale micronodulare diffuso che suggeriva un coinvolgimento neoplastico metastatico dei polmoni. L'esame emocromocitometrico rivelava una moderata anemia normocitica normocromica (RBC 3.800.000/ μ L, Hb 9 g/dL, Ht 20,1%, MCV 51,8 fL, MCHC 44,78%) e una leucocitosi neutrofila estrema (297.000 WBC/ μ L). Il quadro citologico del campione ottenuto per ago aspirazione ecoguidata dei noduli polmonari era compatibile con neoplasia epiteliale maligna, mentre l'esame citologico della neoformazione mammaria risultava inconclusivo. Considerate la diagnosi e la prognosi infauste il proprietario rifiutava ulteriori approfondimenti. Il gatto trattato con terapia di supporto mostrava un progressivo scadimento delle condizioni generali e veniva perciò soppresso 30 giorni dopo la prima visita. L'esame necroscopico ed istopatologico hanno dimostrato la presenza di un adenocarcinoma mammario metastatizzante a livello di polmone e milza. L'esame citologico del midollo osseo ha permesso di evidenziare iperplasia mieloide e lievi segni di displasia granulocitaria.

La leucocitosi neutrofila estrema è un reperto ematologico non molto frequente che propone un difficile diagnostico differenziale tra cause infettive, infiammatorie, neoplastiche-non-emopoietiche e cause neoplastiche emopoietiche (leucemie mieloidi croniche). Neppure tecniche diagnostiche avanzate quali la citofluorimetria o le colorazioni immunoistochimiche possono esprimere una diagnosi di certezza. Nel caso descritto in base al segnalamento, ai reperti clinico patologici e autoptici è stato possibile sospettare in prima ipotesi una leucocitosi neutrofila estrema di origine paraneoplastica.

Parole chiave: Leucocitosi, neutrofilia, adenocarcinoma, gatto.

EXTREME NEUTROPHILIC LEUKOCYTOSIS IN A CAT WITH A MAMMARY ADENOCARCINOMA AND PULMONARY AND SPLENIC METASTASES.

A 8-year old female domestic shorthair cat was brought to a referring veterinarian for coughing and dysorexia. Physical examination revealed a single nodular mass involving the right caudal mammary gland and a mild dyspnoea: in spite of these clinical findings, the cat seemed to be well-being. Thoracic radiographs suggested a pulmonary pattern of metastasis. A complete blood cell count revealed an extreme neutrophilic leukocytosis (297.000/ μ L) and a mild non regenerative anaemia. Fine needle aspiration biopsy of pulmonary nodules was consistent with malignant epithelial neoplasia. One month later, despite therapy, patient's general condition worsened and the cat was euthanized. Necropsy and histopathology revealed a primary adenocarcinoma of the mammary gland and a metastatic involvement of spleen and both lungs. A bone marrow aspirate showed myeloid hyperplasia and mild granulocytic dysplasia.

Extreme neutrophilic leukocytosis is an uncommon hematological finding which can appear during inflammatory and infective diseases, nonmyelopoietic neoplasms, or chronic myeloid leukemias. In the present case, based on signalament, clinico-pathological findings and necropsy, a paraneoplastic extreme neutrophilic leukocytosis was first suspected.

Key words: Leukocytosis, neutrophilia, adenocarcinoma, cat.

INTRODUZIONE

Un gatto comune europeo femmina di 8 anni è stato condotto dal veterinario curante per disoressia e tosse. Gli approfondimenti diagnostici eseguiti sul soggetto hanno evidenziato una neoplasia epiteliale maligna polmonare ed una leucocitosi neutrofila estrema. L'esame autoptico e gli esami istopatologici hanno confermato la presenza di un

adenocarcinoma mammario metastatizzante a milza e polmoni. In base ai reperti clinico-patologici si è sospettato che la leucocitosi neutrofila estrema manifestata dal gatto fosse di origine paraneoplastica.

CASE REPORT

Il caso descritto riguarda un gatto comune europeo femmina di 8 anni, riferito al veterinario curante per disoressia ed episodi di tosse che perduravano da circa una settimana. Alla visita clinica è stato possibile rilevare una lieve dispnea ed una piccola neoformazione nodulare a livello di mammella inguinale destra. Eccettuate le alterazioni descritte, il soggetto appariva in buone condizioni generali. I radiogrammi del torace evidenziavano a livello polmonare un pattern interstiziale micronodulare diffuso che suggeriva un possibile coinvolgimento neoplastico metastatico dei polmoni. L'esame citologico del nodulo mammario era inconclusivo, mentre l'esame citologico per ago aspirato ecoguidato dei noduli polmonari è risultato compatibile con neoplasia epiteliale maligna (fig.1) evidenziando la presenza di aggregati di cellule epiteliali pleomorfe caratterizzate da notevoli segni di atipia nucleare e citoplasmatica (anisomacrocariosi, anisocitosi). In alcuni campi tali cellule formavano strutture ghiandolari; era presente inoltre un notevole infiltrato flogistico a carattere prevalentemente neutrofilico del quale non si poteva però escludere la derivazione ematica, data l'estrema leucocitosi del soggetto. L'esame emocromocitometrico rivelava infatti accanto ad una moderata anemia normocitica normocromica non rigenerativa (RBC 3.800.000/ μ L, Hb 9 g/dL, Ht 20,1%, MCV 51,8 fL, MCHC 44,78%; CRP 0), una leucocitosi neutrofila estrema (297.000 WBC/ μ L) caratterizzata dalla seguente formula leucocitaria: neutrofili maturi 92%, neutrofili a banda 3%, monociti 4%, linfociti 1%, eosinofili 0%. I segni di tossicità erano scarsi (basofilia e vacuolizzazioni citoplasmatiche all'interno dei neutrofili) ed erano presenti occasionalmente forma immature mieloidi e metarubriciti (fig.2). Trenta giorni circa dopo la prima visita le condizioni generali del gatto erano molto peggiorate: si erano formati un versamento toracico ed uno addominale e l'animale era gravemente dispnoico e anoressico da qualche giorno; in accordo con i proprietari, si è quindi optato per l'eutanasia. L'esame emocromocitometrico effettuato durante quest'ultima visita dimostrava ancora una lieve anemia normocitica normocromica non rigenerativa (RBC 5.000.000/ μ L, Hb 7,8 gr/dl, Ht 23,8%, MCV 47,5 fL, MCHC 32,7 %, CRP 0,5) ed una leucocitosi neutrofila estrema di 140.000 WBC/ μ L (neutrofili maturi 81%, neutrofili a banda 1%, monociti 5%, linfociti 13%, eosinofili 0%). I segni di tossicità apparivano più marcati rispetto all'esame precedente. Immediatamente dopo il decesso dell'animale è stato effettuato l'esame citologico del midollo: il campione si presentava iperplastico, con un rapporto mieloide/eritroide (M:E) di circa 7. La linea mieloide appariva iperplastica e rappresentata prevalentemente da forme mature. I blasti mieloidi rappresentavano il 5% delle cellule nucleate totali ed erano inoltre visibili moderati segni di displasia mieloide (fig.3). Sull'animale è stato infine effettuato l'esame necroscopico, mentre l'esame istopatologico eseguito sui tessuti prelevati ha dimostrato la presenza di un adenocarcinoma mammario metastatizzante a milza e polmoni (fig. 4 e 5).

DISCUSSIONE

Con il termine di leucocitosi neutrofila estrema in medicina veterinaria si indica una leucocitosi maggiore di 50.000 leucociti/ μ L nel cane e nel gatto e maggiore di 30.000 leucociti/ μ L nel cavallo e nel bovino, con netta predominanza di granulociti neutrofili maturi (1). Alla base di una tale drastica leucocitosi vi è un'umentata granulopoiesi (midollare ed in alcuni casi extramidollare, da parte di organi quali il fegato e la milza) causata dall'umentata produzione di numerosi fattori di crescita emopoietici (2). In medicina veterinaria le condizioni patologiche durante le quali si verifica un'umentata produzione di citochine e chemochine emopoietiche che possono quindi causare una leucocitosi neutrofila estrema sono numerose: tra queste ricordiamo ad esempio i processi infiammatori (ad es. estese aree di necrosi), in particolare localizzati e a carattere suppurativo (soprattutto se complicati da infezioni batteriche, es. piotorace, piometra), le anemie emolitiche, la tossicità da estrogeni nel cane, il sovradosaggio di paracetamolo nel gatto (3), la leucemia mieloide cronica. Anche in corso di neoplasia maligna può verificarsi una leucocitosi estrema (con neutrofilia, eosinofilia o monocitosi) alla base della quale vi è una patogenesi particolare. Le cellule neoplastiche possono infatti esprimere i geni che codificano per alcune citochine emopoietiche che vengono quindi prodotte in grande quantità stimolando la leucopoiesi: l'effetto finale è una leucocitosi estrema che si definisce paraneoplastica. In medicina umana questa patogenesi è ampiamente dimostrata (4) e l'espressione di geni codificanti i fattori di crescita emopoietici è stata verificata in numerosi tumori. Le citochine che hanno l'effetto più imponente sulla produzione dei granulociti e che sono più frequentemente coinvolte in tale processo sono il Granulocyte Colony Stimulating Factor (G-CSF), il Granulocyte-Monocyte Colony Stimulating Factor (GM-CSF) e le Interleuchine 3 e 5 (IL3, IL5) (5), ma ve ne sono molte altre. In medicina veterinaria si trovano alcuni lavori che documentano neutrofilie estreme in pazienti affetti da neoplasia maligna: in tali lavori gli autori sospettano una leucocitosi paraneoplastica perché escludono altre cause di leucocitosi oppure poiché asportando chirurgicamente il tumore verificano la scomparsa della leucocitosi: sulla scorta della letteratura umana propongono quindi l'ipotesi che queste neoplasie producano fattori di crescita emopoietici (6, 7, 8, 9). Soltanto un lavoro dimostra la presenza dell'RNA che codifica per il G-CSF nelle cellule di un carcinoma della

ghiandole sudoripare di un gatto e per il GM-CSF e per il G-CSF nelle cellule di un carcinoma polmonare di un cane (10). In medicina veterinaria non è possibile dimostrare nella pratica clinica la presenza dei geni che codificano per i fattori di crescita emopoietici nel tessuto neoplastico, né misurare i livelli sierici di tali fattori; le metodiche utilizzate in questi casi non sono infatti disponibili nei laboratori di analisi veterinarie. Si può quindi sospettare una leucocitosi paraneoplastica in un animale portatore di tumore quando altre cause di leucocitosi vengono escluse. Nel nostro caso, abbiamo escluso la possibilità che una forma infettiva potesse essere alla base della leucocitosi poiché il gatto non aveva ipertermia al momento della prima visita e poiché non c'è stata nessuna risposta alla terapia antibiotica somministratagli. L'ipotesi che la necrosi presente all'interno del tessuto neoplastico potesse evocare la leucocitosi è stata considerata poco verosimile dal momento che la necropsia non ha evidenziato aree di necrosi molto estese; si suppone che 30 giorni prima (momento in cui il soggetto manifestava una leucocitosi più intensa rispetto al momento dell'autopsia) tali focolai fossero ancora meno estesi. Differenziare una leucocitosi neutrofila estrema da una leucemia mieloide cronica è molto difficile se non impossibile: in medicina umana viene fatta una diagnosi genetica ricercando il cromosoma Philadelphia oppure si possono avere indicazioni dalla misurazione della fosfatasi alcalina granulocitaria, mentre l'applicabilità di tali indagini diagnostiche in medicina veterinaria non è stata confermata. Possiamo soltanto commentare come fosse improbabile che il nostro paziente avesse sia un adenocarcinoma metastatizzante sia una neoplasia mieloide.

CONCLUSIONI

Purtroppo non è stato possibile giungere nel nostro caso a definire con certezza la patogenesi della leucocitosi; ritenendo le altre cause meno probabili abbiamo potuto soltanto considerare l'origine paraneoplastica della leucocitosi neutrofila estrema come quella più verosimile. Malgrado in letteratura vi siano poche segnalazioni di questo tipo di alterazione ematologica, la possibilità di una patogenesi paraneoplastica andrebbe sempre presa in considerazione ed indagata quando in un paziente viene rilevata una leucocitosi estrema.

BIBLIOGRAFIA

- Gaunt, S.D. 2000. Extreme Neutrophilic Leukocytosis. In: Schalm's Veterinary Hematology, 5th ed., B.F. Feldman, J.G. Zinkl, N.C. Jain (Eds), Williams & Wilkins, pp 347-349.
- Smith, G.S. 2000. Neutrophils. In: Schalm's Veterinary Hematology, 5th ed., B.F. Feldman, J.G. Zinkl, N.C. Jain (Eds), Williams & Wilkins, pp281-296.
- Giordano A., Spagnolo V., Bertazzolo W., Comazzi S. 2002. Paracetamol Poisoning Associated With Leukemoid Response in a Cat. Atti 12° meeting ESVIM/ 4° ESVCP, Monaco (Germania), 19-21 settembre 2002. *Veterinary Clinical Pathology* 31(4):198-199
- Bunn, P.A., Ridgeway, E.C., 2001. Paraneoplastic syndrome. In: DeVita, V.T., Hillman, S., Rosenberg, S.A. (Eds.) *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. 5th ed. Lippincott, Philadelphia, pp 2511-2532.
- Gabrilove, J.L., Golde, D.W. 1993. Hematopoietic growth factors. In: DeVita, V.T., Hillman, S., Rosenberg, S.A. (Eds.) *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. 5th ed. Lippincott, Philadelphia, pp 2275-2291.
- Dole R.S., Catriona M. MacPhail, Lappin M.R. 2004 *Journal of Feline Med. and Surgery* 6, 391-395.
- Lappin M.R., Latimer K.S. 1990. Hematuria and extreme neutrophilic leukocytosis in a dog with renal tubular carcinoma. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 192:1289-1292.
- Thompson J.P., Christopher M.M., Ellison G.W. et al. 1992. Paraneoplastic leukocytosis associated with a rectal adenomatous polyp in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 201: 737-738.
- Chinn D.R., Myers R.K., Matthews J.A. 1985 Neutrophilic leukocytosis associated with metastatic fibrosarcoma in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 186: 806-809.
- Sharkey L.C., Rosol T.J., Grone A. et al. 1996. Production of granulocytic colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by carcinomas in a dog and a cat with paraneoplastic leukocytosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 10: 405-408.

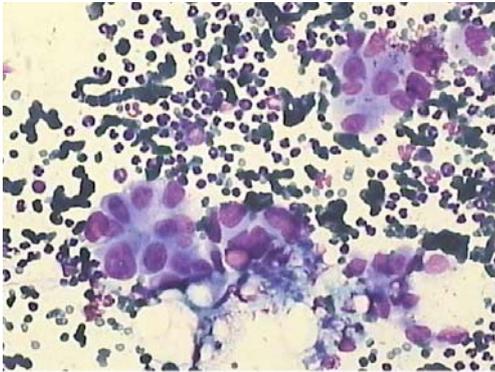


Figura 1. Ago aspirato ecoguidato dei noduli polmonari. MGG, 400X.

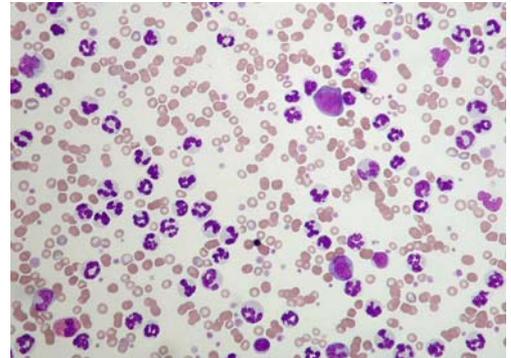


Figura 2. Striscio ematico, MGG, 400X.

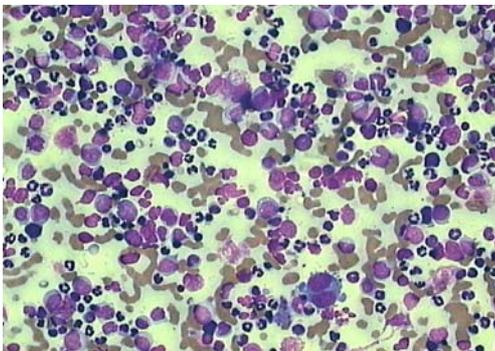


Figura 3. Esame citologico del midollo osseo. MGG, 400X.

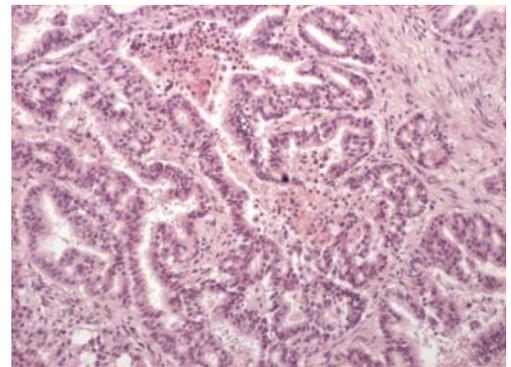


Figura 4. Mammella, EE, 400X.

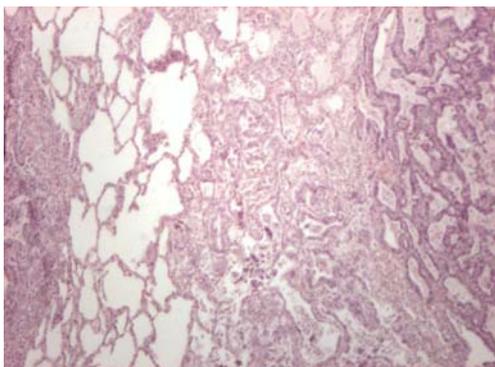


Figura 5. Polmone, EE, 200X.