



AIPVet

ASSOCIAZIONE ITALIANA DI PATOLOGIA VETERINARIA

ATTI V CONGRESSO NAZIONALE

V CONGRESSO NAZIONALE

aipvet

**Associazione Italiana
di Patologia Veterinaria**

 **PALERMO
Hotel PALACE Mondello
15 - 16 Maggio 2008**



MONDELLO (PA)

15-16 Maggio 2008



Premio Ennio Sanna 2008

PROLATTINOMI IPOFISARI E SPETTRO DEI TUMORI MAMMARI IN TOPI FVB FEMMINE WILD
TYPE DI 20-25 MESI DI ETÀ

Radaelli Enrico, Andrew Arnold, Papanikolaou Alexandros, Scanziani Eugenio, Cardiff D. Robert

Premio Rosario Preziosi 2008

STUDIO COMPARATO SUL PROFILO BIOMOLECOLARE ED IMMUNOISTOCHEMICO DEL
TUMORE A CELLULE GIGANTI DELL'OSSO (TCGo) NELLE SPECIE FELINA E CANINA

Leonardi Leonardo, Ciorba Alessandro, Susta Leonardo, Pazzaglia Laura, Benassi Maria Serena

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

Relazioni ad invito

I mammiferi marini indicatori dei cambiamenti oceanici

Gulland Frances

Epidemiologia e sorveglianza della West Nile Disease in Italia: rischio epidemico legato alle variazioni dell'ecosistema?

Lelli Rossella

Neuropatologia da virus West Nile: aspetti comparativi tra l'uomo ed il cavallo

Salvadori Claudia

Tubercolosi bovina: nuove emergenze, rischi e serbatoi ambientali

Bollo Enrico, Di Marco Vincenzo

Malattie da prioni: caratteristiche e rischi per la salute umana delle forme atipiche di BSE

Caramelli Maria

L'Influenza aviaria in Italia e nel mondo: fattori di rischio e strategie d'intervento

Terregino Calogero

Comunicazioni

LIPOSARCOMA PLEOMORFO A LOCALIZZAZIONE MAMMARIA IN UN CANE

Bionda S., Marras V., Cabras F.L., Nieddu A.M., Pirino S., Antuofermo E.

ESPRESSIONE DELLA ENDOTELINA 1 E DEL RECETTORE A IN TUMORI MAMMARI DI CAGNA. INDAGINI PRELIMINARI

Martano M., Restucci B., Mogavero S., Maiolino P.

ESPRESSIONE DI HER 2 NEI TESSUTI MAMMARI SANI, DISPLASTICI E NEOPLASTICI DELLA CAGNA: INDAGINI PRELIMINARI SULL'IMPIEGO DI DIVERSE METODICHE DI IMMUNOISTOCHEMICA E CRITERI DI VALUTAZIONE

Ressel L., Puleio R., Monteverde V., Schiavo M.R., Loria G.R., Millanta F., Caracappa S., Poli A.

ESPRESSIONE DI HER-2 NELLA GHIANDOLA MAMMARIA DEL GATTO: ASPETTI TECNICI E CONFRONTO CON ESPRESSIONE DI P53 E KI67

Rasotto R., Caliarì D., Zappulli V., Bargelloni L., Castagnaro M.

EFFETTO DELLA RESTRIZIONE CALORICA SULLE MODIFICAZIONI EPATICHE LEGATE AI PROCESSI DI INVECCHIAMENTO NEL MODELLO ANIMALE KILLIFISH TURCHESE (*NOTHOBRANCHIUS FURZERI*, JUBB 1971)

Di Cicco E., Cellerino A., Terzibasi E., Renzoni G., Rossi G.

UTILITÀ DELLA CALRETININA QUALE MARKER IMMUNOISTOCHEMICO PER LO STUDIO DEI PNST DEI PESCI

Marino F., Sfacteria A., Sferrazza I., Panebianco A., Mazzullo G.

SHELL DISEASE SYNDROME IN *CARCINUS MEDITERRANEUS* (CZERNIAVSKY, 1884, CRUSTACEA, DECAPODA) ALLA FOCE DEL FIUME VOLTURNO (CE)

Carella F., Maiolino P., De Vico G.

DISPROPORZIONE CONGENITA DEL TIPO FIBRALE NEL PULEDRO: UNA NUOVA ENTITÀ PATOLOGICA

Paciello O., Pasolini M.P., Russo A., Potena A., Trapani F., Papparella S.

LE CELLULE INTERSTIZIALI DI CAJAL NELL'INTESTINO DI CAVALLO: STUDIO MORFOQUANTITATIVO IN CAVALLI NORMALI E IN CAVALLI COLICI

Pavone S., Ricci G., Vitellozzi G., Mandara M.T.

MORFOPATOLOGIA TIROIDEA IN CAVALLI DELL'EST EUROPA

Perillo A., Paciello O., Tinelli A., Losacco C., Passantino G., Russo V., Roperto F.

IL PAPILOMAVIRUS TIPO 2 NEL SANGUE DI BOVINI AFFETTI DA TUMORI VESCICALI

Brun R., Borzacchiello G., Roperto S., Russo V., Urraro C., Venuti A., Roperto F.

PrPSc NEL SISTEMA OLFATTIVO DI PECORE AFFETTE DA SCRAPIE NATURALE

Corona C., Porcaro C., Martucci F., Iulini B., Manea B., Mazza M., Palmitessa C., Gallo M., Caramelli M., Casalone C.

DIAGNOSI DI CONFERMA MEDIANTE ESAME IMMUNOISTOCHEMICO SU CASI DI BSE CLASSICA, L-TYPE E H-TYPE: CONFRONTO FRA LA METODICA ITALIANA ED AMERICANA

Porcaro C., Hall M., Corona C., Iulini B., Gazzuola P., Lund S., Caramelli M., Richt J., Casalone C.

ESPRESSIONE GENICA DI LTA E LTB IN ORGANI DI OVINI CON DIFFERENTI QUADRI LESIVI LINFOPROLIFERATIVI DA VIRUS MAEDI-VISNA

Cancedda G.M., Maestrale C., Galistu A., Attene S., Demontis F., Macciocu S., Carta A., Santucci C., Denti S., Saba M., Crudeli S., Ligios C.,

INDAGINI ISTOLOGICHE E CARATTERIZZAZIONE DELL'INFILTRATO INFIAMMATOIO NELL'INTESTINO TENUE DI CAPRE NATURALMENTE INFETTE DA TRICOSTRONGILI

Trapani F., Inverso D., Rinaldi L., Veneziano V., Maiolino P., Paciello O., Cringoli G., Papparella S.

L'ALPHA-1 GLICOPROTEINA ACIDA MODULA SELETTIVAMENTE LA DEGRANULAZIONE DEI NEUTROFILI BOVINI

Miranda-Ribera A., Lecchi C., Bronzo V., Scaccabarozzi L., Sartorelli P., Franciosi F., Cecilian F.

E-CADERINA E BETA-CATENINA DOWN-EXPRESSION NELLE CELLULE TUBULARI EPITELIALI NELLE PATOLOGIE RENALI NEL CANE

Aresu L., Rastaldi M.P., Pregel P., Valenza F., Radaelli E., Scanziani E., Castagnaro M.

IL RUOLO DELLA MIOSTATINA NELL'ATROFIA DEI MUSCOLI MASTICATORI DEL CANE

Paciello O., Costagliola A., Wojcik S., Trapani F., Papparella S.

EMBOLIA FIBROCARILAGINEA DEL MIDOLLO SPINALE IN UN LEONE (*PANTHERA LEO*)

Ricci E., Cavicchio P., Arispici M., Cantile C.

MIXOMA DELLE GUAINI DEI NERVI PERIFERICI. STUDIO CLINICOPATOLOGICO E IMMUNOISTOCHEMICO DI UN TUMORE MIXOIDE DELLA GUAINA DEI NERVI PERIFERICI IN UN ARTO ANTERIORE DI UN GATTO

Anfossi A., Mura A., Meloni F., Pintore L., Bionda S., Leoni A., Antuofermo E.

PRIMA SEGNALAZIONE DI UN CASO DI TUMORE MISTO MULLERIANO DELL'OVAIO IN UN CANE

Antuofermo E., Cocco R., Borzacchiello G., Burrari G.P., Meloni F., Pirino S., Cossu-Rocca P., Bosincu L.

PROFILI PROTEOMICI IN TUMORI UROTELIALI BOVINI

Urraro C., Brun R., Raso C., Roperto S., Russo V., Roperto F.

DUE CASI DI TUMORE NASALE ENZOOTICO DELLA PECORA IN UMBRIA

Lepri E., Filippini G., Mattiacci S., Pezzotti G., Vitellozzi G.

ESPRESSIONE DI C-KIT IN TESTICOLI NORMALI E NEOPLASTICI DI CANE - RISULTATI PRELIMINARI

Grieco V., Giudice C., Mosca F., Finazzi M.

PROLATTINOMI IPOFISARI E SPETTRO DEI TUMORI MAMMARI IN TOPI FVB FEMMINE WILD TYPE DI 20-25 MESI DI ETÀ

Radaelli E., Andrew A., Papanikolaou A., Scanziani E., Cardiff D.R.

Poster

VALUTAZIONE DELLE ALTERAZIONI ANATOMO-ISTO-PATOLOGICHE IN ORGANI BERSAGLIO DI BOVINI MACELLATI NELLA REGIONE SARDEGNA RICONDUCIBILI ALL'IMPIEGO ILLECITO DI PROMOTORI DI CRESCITA. RISULTATI PRELIMINARI

Anfossi A., Appino S., Busia G., Cannizzo F.T., Spada F., Pisano A., Leoni A.

REPERTI ANATOMO-ISTOPATOLOGICI DELLA CALCINOSI NELLE CAPRE: INDAGINI PERSONALI

Di Marco V., Loria G.R., Settineri F., Aronica V., Mazzola A., Russo M., Capucchio M.T.

PRESENZA DI CROMO ESAVALENTE IN TROTE FARIO DEL FIUME LETE (CE): RILIEVI CHIMICI ED ANATOMO-ISTOPATOLOGICI

De Vico G., Cataldi M., Coppola M., Carella F., Di Napoli A., Ioannone L., Mongillo A., Melluso G.

LESIONI COMPATIBILI, MA LABILI TRACCE DI MORBILLIVIRUS: COSA HA PROVOCATO I RECENTI EPISODI DI MORTALITÀ NELLE STENELLE (*STENELLA COERULEOALBA*) DEL MAR LIGURE?

Di Guardo G., Proietto U., Di Francesco C.E., Marsilio F., Zaccaroni A., Scaravelli D., Mignone W., Caroggio P., Garibaldi F., Ballardini M., Kennedy S., Forster F., Bozzetta E., Iulini B., Casalone C.

ASPETTI CLINICI E ANATOMO-ISTOPATOLOGICI DI UNA FORMA ESANTEMATICA DI FEBBRE CATARRALE MALIGNA (MCF)

Di Marco V., Russo M., Aronica V., Bartolone C., Biondo G., Tumeo G., Fiasconaro M., Capucchio M.T.

DIFFUSA METAPLASIA OSSEA DELLE SIEROSE IN UN VITELLO

Di Marco V., Russo M., Aronica V., Tomaselli A., Amedeo S., Sereno A., Fiasconaro Mi., Capucchio M.T.

TUBERCOLOSI OVINA: REPERTI ANATOMO-ISTOPATOLOGICI DI UN RARO CASO DI TUBERCOLOSI GENERALIZZATA

Di Marco V., Marianelli Ci., Russo M., Tomaselli A., Fiasconaro Mi., Capucchio M.T., Caracappa S.

GRANULOMATOSI DEL TESSUTO LINFOIDE IN CORSO DI PMWS: CONFRONTO TRA FASE EPIDEMICA ED ENDEMICA DELLA MALATTIA

Fusaro L., Sarli G., Morandi F., Bacci B., Ostanello F., Leotti G., Mandrioli L., Marcato P.S.

DISGENESIA OCULARE BILATERALE IN UN CERBIATTO (*CERVUS ELAPHUS*)

Gelmetti D., Giudice C., Invernizzi A., Bertoletti I.

INUSUALI QUADRI DI PATOLOGIA SPONTANEA IN KAKARIKI FRONTEROSSA
(*CYANORANPHUS NOVAZELANDIAE*)

Lanteri G., Marino F., Rapisarda G., Augello A., Macrì B.

STUDIO COMPARATO SUL PROFILO BIOMOLECOLARE ED IMMUNOISTOCHEMICO DEL
TUMORE A CELLULE GIGANTI DELL'OSSO (TCGo) NELLE SPECIE FELINA E CANINA

Leonardi L., Ciorba A., Susta L., Pazzaglia L., Benassi M.S.

EVIDENZA DI FIBRE DI FLUOROEDENITE IN POLMONI DI RODITORI SELVATICI DELL'AREA
DI BIANCAVILLA (CT)

Loria G.R., Schiavo M.R., Monteverde V., Manno C., Sparacino L., Militello C., Tamburello A., Di Bella C., Caracappa S.

LESIONI PARASSITARIE OSSERVATE IN CIGNI REALI (*CYGNUS OLOR*) IN SICILIA.
DESCRIZIONE DEL CASO

Manno C., Pizzo L., Monteverde V., Ghisleni G., Loria G.R.

VALUTAZIONE QUALI-QUANTITATIVA DELL'INNERVAZIONE DELLE PLACCHE DEL PEYER
ILEALI IN OVINI DI RAZZA SARDA INDENNI O AFFETTI DA SCRAPIE

Marruchella G., Ligios C., Baffoni M., Cancedda G.M., Madau L., Chiocchetti R., Clavenzani P., Lalatta-Costerbosa G., Di Guardo G.

RUOLO DELL'ENZIMA 5-LIPOSSIGENASI (5-LOX) NELLA PATOGENESI DELLA
BRONCOPOLMONITE VERMINOSA DEL SUINO: INDAGINI IMMUNOISTOCHEMICHE E
BIOCHIMICHE

Marruchella G., Giacomini-Stuffler R., Baffoni M., Maccarrone M.

DIPROSOPUS TETRAOPHTALMUS IN UN VITELLO: ASPETTI ANATOMO-PATOLOGICI E
RADIOGRAFICI

Mazzullo G., Vanadia Bartolo A., Vanadia Bartolo D., Di Martino V., Macrì F.

DERADELPHOUS CEPHALOTHORACOPAGUS (OCTOPUS BIAURITUS) IN DUE GATTINI: ASPETTI
ANATOMO-PATOLOGICI E RADIOLOGICI

Mazzullo G., Imburgia V., Bergamaschi El., Luzio Alfieri C., Macrì F.

DUE CASI DI TIMOFIBROLIPOMA NEL CANE

Morini M., Bettini G., Casadio Tozzi A., Mandrioli L., Spadari Al., Diana A., Scarpa F., Romagnoli N.

DESCRIZIONE DI UN CASO DI ERMAFRODITISMO NEL CANE

Puleio R., Mancuso R., Napoli R., Nocera G., Mira L., Monteverde V.

LA PROTEINA DI FASE ACUTA ALFA-1-GLICOPROTEINA ACIDA È CONTENUTA NEI GRANULI
DEI NEUTROFILI BOVINI E VIENE RILASCIATA A SEGUITO DI ATTIVAZIONE PRO-
INFIAMMATOIA

Rahman M.Md, Miranda-Ribera A., Lecchi C., Bronzo V., Sartorelli P., Franciosi F., Cecilian F.

EMANGIOMA EPISCLERALE IN UN GATTO, DESCRIZIONE DEL CASO (DATI PRELIMINARI)

Ratto A., Monteverde V., Crasta M., Modesto P., Tamburello A., Loria G.R., Ferrari A.

VALIDAZIONE DELLA REATTIVITA' IMMUNOISTOCHEMICA DI UN PANNELLO ANTICORPALE
IN DIVERSE SPECIE ITTICHE MEDIANTE L'IMPIEGO DI "TISSUE ARRAYS"

Sbirri R., Mandrioli L., Morini M., Cesari A., Bettini G.

EPENDIMOMA SPINALE IN UN CANE DI DUE ANNI DI ETÀ'

Sfacteria A., Macrì F., Perillo L., Rapisarda G., Lanteri G.

IL VAIOLO DEL CANARINO: RILIEVI ANATOMO-ISTOPATOLOGICI

Todisco G., Moreno A., Luppi A., Marruchella G.

MESOTELIOMA SCLEROSANTE INVASIVO IN UN CANE

Varello K., Pezzolato M., Rossi F., Zoppi S., Borlatto L., Bozzetta E.

MICROFTALMIA ED AFACHIA ASSOCIATE AD ANOMALIE DI SVILUPPO OCULARE IN UN CERVO (*CERVUS ELAPHUS*) SELVATICO DELL'ETÀ DI DUE MESI

Vascellari M., Vercelli A., Carminato A., Luchesa L., Pasolli C., Cova M., Mutinelli F.

INDAGINI ANATOMOPATOLOGICHE SU TARTARUGHE *CARETTA CARETTA* RINVENUTE SULLA COSTA PUGLIESE

Zizzo N., Appino S., Prearo M., Anfossi A., Zucca D., Prunella V., Villone V., Tinelli A., Bollo E.

VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF) NELL'ATTIVITÀ ANGIOGENETICA DEI MASTOCITOMI CANINI

Zizzo N., Patruno R., Tinelli A., Passantino L., Arpaia N., Ranieri G.

LIPOSARCOMA PLEOMORFO A LOCALIZZAZIONE MAMMARIA IN UN CANE

Bionda Stefano¹, Marras Vincenzo², Cabras Francesca L.¹, Nieddu Antonio M.¹, Pirino Salvatore¹, Antuofermo Elisabetta¹

¹Sez. di Patologia Generale e Anatomia Patologica. Dipartimento di Patologia e Clinica Veterinaria. Facoltà di Medicina Veterinaria. ²Istituto di Anatomia e Istologia Patologica. Facoltà di Medicina e Chirurgia. Università degli Studi di Sassari

Il liposarcoma umano è una delle più frequenti neoplasie dei tessuti molli. Nel cane rappresenta lo 0,5% di tutti i tumori cutanei e sottocutanei. Come in medicina umana il liposarcoma canino è classificato in lipoma atipico, liposarcoma ben differenziato, liposarcoma mixoide e liposarcoma pleomorfo. Il liposarcoma è stato descritto anche in sedi extracutanee. Il liposarcoma primario della mammella nel cane è estremamente raro. Nella donna questa neoplasia rappresenta lo 0,3% di tutti i sarcomi primari della ghiandola mammaria. Scopo del nostro lavoro è descrivere un caso di liposarcoma primario nella mammella inguinale destra in un cane barboncino di 14 anni di età. L'esame citologico evidenziava una popolazione neoplastica di cellule atipiche con nuclei pleomorfi e multilobati. Macroscopicamente la neoplasia aveva un aspetto multilobulato e ben circoscritto e consistenza molle-elastica. I campioni venivano fissati in formalina e processati secondo metodiche istochimiche (E.E., Blu di Toluidina, PAS, Alcian Blu) ed immunoistochimiche, per valutare l'espressione di *markers* epiteliali (pancitocheratine), mesenchimali (vimentina, S-100), neuronali (GFAP). All'istologia si osservava la proliferazione intraparenchimale di cellule pleomorfe con vacuolizzazioni lipidiche di grandezza variabile. Singole microcalcificazioni erano inoltre presenti. Le cellule risultavano positive per VIM ed S-100 e negative per CK, e GFAP. La forte somiglianza tra il caso da noi descritto ed il liposarcoma pleomorfo riportato nella mammella della donna indicano ancora una volta la specie canina come un valido modello animale per lo studio di questa rara neoplasia nella specie umana.

Parole chiave: cane, liposarcoma, mammella; immunoistochimica.

CANINE PLEOMORPHIC LIPOSARCOMA OF MAMMARY GLAND

Liposarcoma is the most common malignant soft tissue tumors in humans, whereas in dog is an uncommon neoplasm of all skin and subcutaneous tumors. Lipocytic tumors have been categorized as atypical lipoma, well differentiated liposarcoma, myxoid liposarcoma and pleomorphic liposarcoma. Liposarcoma can also develop in others extracutaneous sites. Primary canine liposarcoma arise mammary gland are extremely rare. In woman liposarcoma of the breast represent only 3% of all primary breast sarcoma. The aim of our study was to investigate on mammary liposarcoma of a poodle bitch. Fine needle aspiration cytology showed atypical cells with lobulated and giants nuclei. A nodule with well circumscribed margins and fatty consistency appeared at macroscopic examination. Mammary specimens were formalin fixed and processed for histology. Sections were immunostained with antibodies anti pan-cytokeratins, anti-vimentin, anti S-100, and anti-GFAP. Histology reveled highly pleomorphic polygonal cells with variable lipidic vacuolations with an intraparenchymal mammary growth. Microcalcifications were also observed. Malignant lipocytes were diffusely positive for VIM and S-100 protein and negative for CK and GFAP. This is a remarkable case of primary pleomorphic liposarcoma described in dog arise mammary gland, with clinical histopathological and immunohistochemical findings similar to woman breast liposarcoma.

Key words: dog, liposarcoma, mammary gland, immunohistochemistry.

ESPRESSIONE DELLA ENDOTELINA 1 (ET1) E DEL RECETTORE A (ET_AR) NEI TUMORI MAMMARI DELLA CAGNA. INDAGINI PRELIMINARI

Martano M.*, Mogavero S., Maiolino P., Restucci B.

*Dipartimento di Patologia e Sanità animale – Facoltà di Medicina Veterinaria – *Facoltà di Scienze Biotecnologiche; Università Federico II Napoli*
manuela.martano@unina.it; brunella.restucci@unina.it

L'asse delle Endotelina e dei suoi recettori gioca un ruolo di grande importanza nella crescita e nella progressione neoplastica. In particolare l'ET1 viene considerata un ottimo fattore prognostico in molti tipi di neoplasie e gli antagonisti dell'Et_AR vengono oggi utilizzati in diverse terapie antineoplastiche nell'uomo. Scopo di questo studio è quello di valutare l'espressione dell'ET1 e dell' Et_AR in 30 neoplasie mammarie di cagna e di correlarla con il grado istologico e con il potenziale angiogenetico. I campioni, fissati in formalina al 10%, inclusi in paraffina, classificati seguendo i criteri del WHO e graduati in base ai parametri dettati da Misdorp, sono stati sottoposti a metodica immunistochemica e al Western blot utilizzando anticorpi monoclonali anti ET1, anti Et_AR e anti VEGF. La metodica immunistochemica evidenziava un progressivo aumento dell' espressione di tali molecole nelle cellule epiteliali dei carcinomi con grado di malignità più elevato (grado 3); tale espressione era confermata dal Western blot, positivo in tutti i campioni neoplastici maligni. L'espressione di ET1 e di Et_AR risultava, inoltre, direttamente correlata con l'espressione del VEGF. I risultati ottenuti sembrano suggerire che l'incremento dell'espressione dell'ET1 e di Et_AR potrebbe essere associato con l'incremento dell'espressione del VEGF e quindi con un aumento della densità microvascolare, diretta espressione del potenziale angiogenetico di una neoplasia. L'asse ET1- Et_AR, pertanto, insieme al VEGF, può certamente essere considerato un ottimo indice per la valutazione del potenziale di malignità nelle neoplasie mammarie del cane.

Parole chiave : endotelina, recettore, tumori mammary,cane

INTRODUZIONE

Le endoteline sono dei potenti peptidi vasoattivi sintetizzati dalle cellule endoteliali, dalle cellule muscolari lisce dei vasi e dalle cellule epiteliali di diversi organi.

Si conoscono 3 isoforme di endoteline: Endotelina 1 (ET1), Endotelina 2 (ET2) e Endotelina 3 (ET3), che interagiscono con specifici recettori di membrana Recettore A (Et_aR) e recettore B (Et_bR). L'Endotelina 1 ha un'alta affinità per il recettore A, mentre le Endoteline 2 e 3 hanno una maggiore affinità per il recettore B (Bagnato, 2008).

L'asse delle Endoteline e dei suoi recettori, oltre ad avere un ruolo nella vasocostrizione e come mediatore dei disordini renali e cardiocircolatori, gioca un ruolo di grande importanza nella crescita e nella progressione neoplastica partecipando a numerosi processi quali proliferazione cellulare, inibizione dell'apoptosi (Nelson et al, 2005), invasività delle cellule neoplastiche (Spinella et al, 2003), metastasi ed angiogenesi (Wulfing et al, 2004). Per tali motivi le endoteline, in particolare l'ET1, vengono considerate degli ottimi fattori prognostici in molte neoplasie epiteliali dell'uomo, quali tumori ovarici (Bagnato et al, 1999), colon-rettali (Asham et al, 2001), prostatici (Nelson et al, 2000) e mammari (Yamashita et al, 1991). Inoltre, gli antagonisti dell'Et_aR vengono oggi utilizzati in diverse terapie antineoplastiche nell'uomo (Bagnato e Natali, 2004).

Scopo di questo studio è quello di valutare l'espressione dell'ET1 e dell' Et_aR in 30 neoplasie mammarie di cagna e di correlarla con il grado di malignità dei tumori e con il potenziale angiogenetico, a sua volta valutato mediante espressione immunohistochimica del VEGF.

MATERIALI E METODI

I campioni sono stati fissati in formalina al 10%, inclusi in paraffina, tagliati a 5 µm e colorati con ematossilina-eosina. Sono stati classificati seguendo i criteri del WHO (Hampe and Misdorp, 1974) (tabella 1) e graduati in tumori di Grado 1 (ben differenziati), tumori di Grado 2 (moderatamente differenziati) e tumori di Grado 3 (scarsamente differenziati), prendendo in considerazione vari parametri quali il grado di formazione dei tubuli, le irregolarità di dimensioni, forma e colorazione dei nuclei ed il numero di mitosi (Misdorp, 1976).

I campioni sono stati quindi sottoposti a metodica immunohistochimica (streptavidina-biotina-perossidasi) utilizzando anticorpi monoclonali anti- Endotelina 1, anti recettore A e anti-VEGF.

Le cellule positive sono state contate su 1000 cellule neoplastiche (20X) e i risultati espressi in percentuale. I dati ottenuti sono stati correlati statisticamente con il grado istologico dei tumori mediante analisi della varianza e test di regressione lineare.

Ogni campione è stato congelato in isopentano con azoto liquido, omogenato in ghiaccio con tampone JS (Borzacchiello et al, 2007). I lisati proteici sono stati quantizzati con lo spettrofotometro usando il metodo di Bradford, sottoposti ad elettroforesi SDS PAGE al 10% ed analizzati per Western blot con anticorpi monoclonali anti ET1 e anti Et_aR.

RISULTATI

In tutti i campioni neoplastici maligni analizzati con il Western blot è stata riscontrata una positività agli anticorpi anti-ET1 e anti-Et_aR. La metodica immunohistochimica ha evidenziato inoltre un progressivo aumento del numero di cellule positive sia all'ET1 che all'Et_aR nei carcinomi moderatamente e scarsamente differenziati (grafico 1 e tabella 2), specialmente in quelli infiltranti, dove l'espressione immunohistochimica era molto intensa e diffusa in tutto il citoplasma (figure 1 e 2).

L'espressione di ET1 e di Et_aR risultava, inoltre, direttamente correlata con l'espressione del VEGF (tabella 2), che era quindi maggiormente espresso nei tumori scarsamente differenziati rispetto a quelli ben differenziati (fig.3).

DISCUSSIONE

I risultati ottenuti sembrano suggerire che l'incremento dell'espressione dell'ET1 e di Et_aR potrebbe essere associato con l'incremento dell'espressione del VEGF e quindi con un aumento della densità microvascolare, diretta espressione del potenziale angiogenetico di una neoplasia.

Questo risultato può essere spiegato prendendo in considerazione il meccanismo paracrino dell' ET1 sulle cellule endoteliali. Tale proteina, infatti, prodotta dalle cellule neoplastiche, interagisce con il recettore A presente sulle cellule endoteliali e ne stimola la proliferazione (Bagnato e Rosanò,

2008). L'ET1, inoltre, è coinvolta anche in un processo di angiogenesi indiretta, in quanto stimola la sintesi del VEGF (Stiles et al, 1997; Wulfig et al, 2004).

In tale lavoro è stato osservato inoltre un incremento dell'espressione dell'ET1 e Et_aR nei tumori con un grado elevato di malignità, che potrebbe essere spiegato prendendo in considerazione il meccanismo autocrino della ET1 sulle cellule neoplastiche (Bagnato et al, 1997). Il recettore A dell' ET1 è infatti espresso, oltre che dalle cellule endoteliali, anche dalle cellule neoplastiche, che vengono quindi stimulate a proliferare in seguito all'interazione dell'ET1 con il recettore A (Bagnato et al, 1999). Altro risultato interessante è stato quello di un aumento dell'espressione di ET1 e Et_aR nelle aree adiacenti alla necrosi (fig.2). Molti autori infatti hanno dimostrato che l'ipossia, contenuta nelle aree di necrosi, è uno dei principali fattori che stimolano la sintesi di ET1 e Et_aR (Kourembanas et al, 1991, Spinella et al, 2002). L'incremento della produzione di tali proteine è associato all'aumento del VEGF e di nuovi vasi, che risultano però piccoli e deformi, incapaci quindi a provvedere all'ossigenazione di un tessuto neoplastico che ha un indice di proliferazione molto elevato. Ciò determina quindi aumento ulteriore dell'ipossia e della necrosi, con incremento della produzione di ET1 e di Et_aR.

CONCLUSIONI

L'incremento della espressione dell' ET1 e del suo recettore nei tumori scarsamente differenziati è quindi associato ad incremento sia della densità microvascolare che della proliferazione neoplastica, che determina aumento del rischio di diffusione metastatica e di crescita del tumore. Per tali motivi, l'asse ET1- Et_aR, insieme al VEGF, può certamente essere considerato un ottimo indice per la valutazione del potenziale di malignità nelle neoplasie mammarie del cane.

BIBLIOGRAFIA

- 1) [Asham E, Shankar A, Loizidou M, Fredericks S, Miller K, Boulos PB, Burnstock G, Taylor I](#). Increased endothelin-1 in colorectal cancer and reduction of tumour growth by ET(A) receptor antagonism. [Br J Cancer](#). Nov 30;85(11):1759-63 (2001)
- 2) [Bagnato A, Tecce R, Di Castro V, Catt KJ](#). Activation of mitogenic signaling by endothelin 1 in ovarian carcinoma cells. [Cancer Res](#). 1;57(7):1306-11,1997.
- 3) [Bagnato A, Salani D, Di Castro V, Wu-Wong JR, Tecce R, Nicotra MR, Venuti A, Natali PG](#). Expression of endothelin 1 and endothelin A receptor in ovarian carcinoma: evidence for an autocrine role in tumor growth [Cancer Res](#). Feb 1;59(3):720-7 (1999)
- 4) [Bagnato A, Natali PG](#). Endothelin receptors as novel targets in tumor therapy. [J Transl Med](#). May 27;2(1):16. (2004)
- 5) Bagnato A., Rosanò L. The endothelin axis in cancer, [Int J Biochem Cell Biol](#) (2008)
- 6) Borzacchiello G, Russo V, Spoleto C, Roperto S, Balcos L, Rizzo C, Venuti A, Roperto F. Bovine papillomavirus type-2 DNA and expression of E5 and E7 oncoproteins in vascular tumours of the urinary bladder in cattle. [Cancer Lett](#). 2007 May 18;250(1):82-91. Epub 2006 Nov 27.
- 7) Hampe JF, Misdorp W: Tumours and dysplasia of the mammary gland. [Bull WHO](#) 50:111-113, 197
- 8) Kourembanas S., [Marsden PA, McQuillan LP](#), Faller DV. Hypoxia induces endothelin gene expression and secretion in cultured human endothelium. [J Clin Invest](#). Sep;88(3):1054-7. 1991
- 9) Misdorp W: Histologic classification and further characterization of tumours in domestic animals. [Adv Vet Sci Comp Med](#) 20:191-221, 1976
- 10) Nelson JB, Carducci M. The role of endothelin-1 and endothelin receptor antagonists in prostate cancer. [BJU Int](#). Apr;85 Suppl 2:45-8 (2000)
- 11) Nelson JB, Udan MS, Guruli G, Pflug BR. Endothelin-1 inhibits apoptosis in prostate cancer. [Neoplasia](#). 2005 Jul;7(7):631-7.
- 12) Spinella F, Rosanò L, [Di Castro V, Nicotra MR, Natali PG, Bagnato A](#). Endothelin-1 decreases gap junctional intercellular communication by inducing phosphorylation of connexin 43 in human ovarian carcinoma cells. [J Biol Chem](#). 7;278(42):41294-301 (2003).
- 13) Spinella F, Rosanò I, Di Castro V, Natali PG, Bagnato A. Endothelin-1 induces vascular endothelial growth factor by increasing hypoxia-inducible factor-1alpha in ovarian carcinoma cells. [J Biol Chem](#). 2002 Aug 2;277(31):27850-5. Epub 2002 May 22.
- 14) Stiles JD, [Ostrow PT, Balos LL, Greenberg SJ, Plunkett R, Grand W, Heffner RR Jr](#).

Correlation of endothelin-1 and transforming growth factor beta 1 with malignancy and vascularity in human gliomas. 56(4):435-9,1997

- 15) [Wülfing P](#), [Kersting C](#), [Tio J](#), [Fischer RJ](#), [Wülfing C](#), [Poremba C](#), [Diallo R](#), [Böcker W](#), [Kiesel L](#). Endothelin-1-, endothelin-A-, and endothelin-B-receptor expression is correlated with vascular endothelial growth factor

expression and angiogenesis in breast cancer. [Clin Cancer Res](#). Apr;10(7):2393-400 (2004).

- 16) [Yamashita J](#), [Ogawa M](#), [Inada K](#), [Yamashita S](#), [Matsuo S](#), [Takano SA](#) A large amount of endothelin-1 is present in human breast cancer tissues [Res Commun Chem Pathol Pharmacol](#). Dec;74(3):363-9, 1991

| Neoplasie mammarie | Numero di casi |
|--------------------------|----------------|
| Tumori benigni | |
| Papilloma duttale | 2 |
| Adenoma | 2 |
| Fibroadenoma | 2 |
| Totale | 6 |
| Tumori maligni | |
| Adenocarcinoma papillare | 8 |
| Adenocarcinoma tubulare | 8 |
| Carcinoma solido | 4 |
| Carcinoma squamoso | 4 |
| Totale | 24 |

Tabella 1: classificazione dei tumori in base ai criteri del WHO (Hampe and Misdorp, 1974)

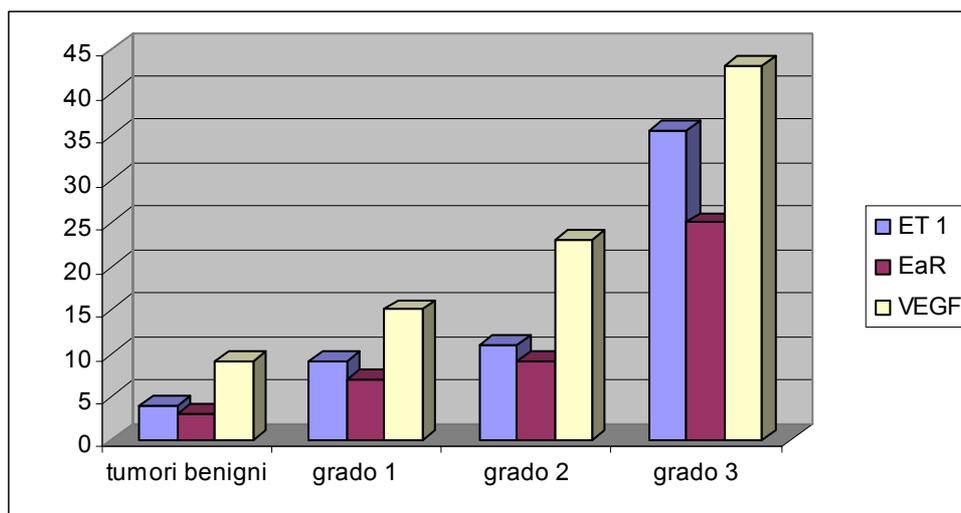


Grafico 1: Distribuzione di ET1, ETaR e VEGF nei tumori benigni e maligni (grado 1, grado 2 e grado 3)

| | Tumori benigni Media ± DS | Tumori maligni Media ± DS | | | Valore di p |
|------|------------------------------|------------------------------|-----------------------|-----------------------|----------------|
| | 6 campioni | Grado 1 10 campioni | Grado 2 7 campioni | Grado 3 7 campioni | |
| ET1 | 4.3 ± 2.16 | 9.03 ± 3.6 | 11.05 ± 3.3 | 35.5 ± 5.9 | p<0.001 |
| ETaR | 3.05 ± 1.07 | 7.02 ± 3.12 | 9.02 ± 4.7 | 25.05 ± 3.4 | p<0.001 |
| VEGF | 9.7 ± 5.5 | 15.2 ± 5.5 | 23.2 ± 5.1 | 43 ± 4.4 | p<0.001 |

Tabella 2 : valori medi del numero di cellule positive agli anticorpi anti ET1 , EtaR e VEGF nei tumori benigni e maligni (grado 1, grado 2 e grado3)

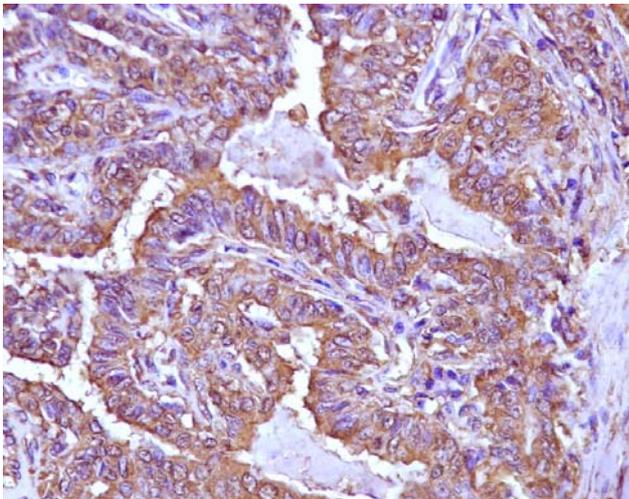


Fig. 1: Adenocarcinoma tubulo-papillare scarsamente differenziato: forte positività citoplasmatica all'anticorpo anti ET1 nella maggior parte delle cellule neoplastiche (20X)

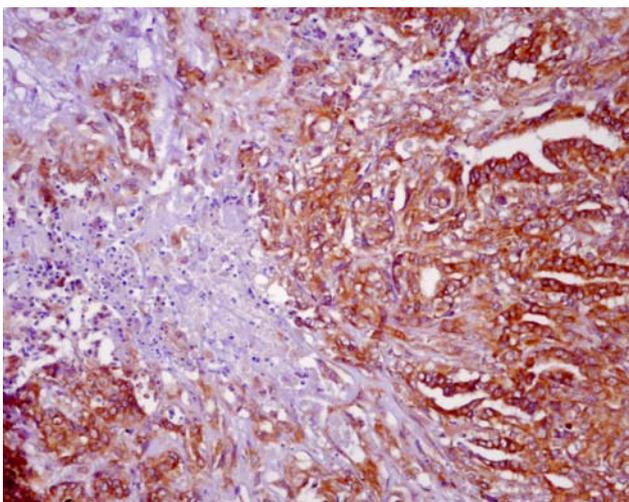


Fig. 2: Carcinoma infiltrante : intensa positività all'anticorpo anti Et_aR nelle propaggini infiltranti e nelle aree adiacenti alla necrosi (40X)

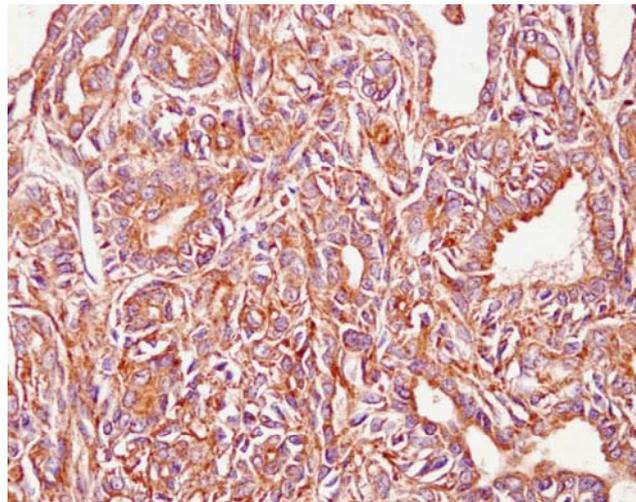


Fig. 3: Adenocarcinoma tubulo-papillare moderatamente differenziato : positività intensa in molte cellule neoplastiche all'anticorpo anti-VEGF (20X)

ENDOTHELIN-1 (ET1) AND ENDOTHELIN-A RECEPTOR (ET_AR) EXPRESSION IN CANINE MAMMARY TUMOURS. PRELIMINARY INVESTIGATIONS

The endothelin axis, comprising endothelin and their receptors, has recently emerged as relevant player in tumour growth and neoplastic progression. Particularly, ET1 is considered a good prognostic factor in numerous tumours and Et_AR antagonists represent a new mechanism-based antitumour strategy. The aim of this study was to evaluate the expression of ET1 and Et_AR in 30 canine mammary tumours, and to correlate them with histological grade and to angiogenetic potential of neoplasms. Samples, formalin fixed and paraffin embedded, classified using WHO criteria and graded using Misdorp parameters, were assessed by Western blot and immunohistochemistry using antibodies for ET1, Et_AR and VEGF.

Western blot analysis demonstrated the expression of ET1 and Et_AR in all malignant neoplastic cells. Moreover, the immunohistochemistry demonstrated that the expression of ET1 and Et_AR was increased in more malignant histological features and was correlated to increase of VEGF expression. These results suggest that the endothelin axis, associated with VEGF, could be considered good factor for evaluating the intrinsic malignancy of canine mammary tumours.

Key words: endothelin, receptor, mammary tumour, dog.

ESPRESSIONE DI HER-2 NEI TESSUTI MAMMARI SANI, DISPLASTICI E NEOPLASTICI DELLA CAGNA: INDAGINI PRELIMINARI SULL'IMPIEGO DI DIVERSE METODICHE DI IMMUNOISTOCHEMICA E CRITERI DI VALUTAZIONE

Ressel Lorenzo¹, Puleio Roberto², Monteverde Vincenzo², Schiavo Maria Rita², Loria Guido Ruggero², Millanta Francesca¹, Caracappa Santo², Poli Alessandro¹

¹Dipartimento di Patologia Animale Profilassi ed Igiene degli Alimenti - Università di Pisa. ²Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia

Il proto oncogene HER-2 (c-erbB2/neu) codifica per un recettore trans-membrana con attività tirosina chinasi, correlato con fattore di crescita epiteliale (EGF) che si ritiene possa giocare un ruolo importante nella cancerogenesi delle neoplasie mammarie dell'uomo e degli animali. Nelle neoplasie mammarie canine, nonostante le diverse pubblicazioni sull'espressione di questo recettore e l'interesse per lo sviluppo di terapie a bersaglio molecolare specifico, le indagini di immunohistochemica non hanno fornito risultati definitivi su una possibile analogia tra uomo e cane, per quel che riguarda l'espressione della proteina e la correlazione di questa con l'andamento clinico delle forme tumorali. Gli autori riportano un'indagine preliminare sull'espressione del recettore in tessuti mammary di cane, mediante una metodica immunohistochemica normalmente applicata e validata in medicina umana (HERCEPTEST[®], DAKO) e di un test analogo sviluppato impiegando lo stesso anticorpo primario policlonale ma con un diverso sistema di rivelazione. Sono stati analizzati n. 20 tessuti mammary sani, n. 9 tessuti mammary iperplastici, n. 11 lesioni tumorali benigne e n. 27 lesioni tumorali maligne, confrontate con n. 4 lesioni mammarie umane. L'espressione di HER-2 è stata valutata mediante lo scoring suggerito da HERCEPTEST[®] e mediante i sistemi di valutazione descritti in letteratura. L'espressione del recettore è stata correlata con i parametri clinici. I risultati preliminari dimostrano che l'espressione di HER-2 dipende dalla metodica immunohistochemica impiegata, dal sistema di valutazione adottato e dalla composizione della popolazione esaminata. L'iperespressione del recettore non sembra individuare un sottogruppo di tumori caratterizzato da limitata aspettativa di vita, come accade in medicina umana.

Parole chiave: Recettore HER-2, tumore mammary, immunohistochemica

HER-2 EXPRESSION IN CANINE HEALTHY, DYSPLASTIC AND NEOPLASTIC MAMMARY TISSUES: A PRELIMINARY INVESTIGATION OF IMMUNOHISTOCHEMICAL PROTOCOLS AND EVALUATION CRITERIA

The proto-oncogene HER-2 (c-erbB2/neu) encodes a trans-membrane receptor with tyrosinekinase activity, which is correlated to human epidermal growth factor (EGF), often involved in human and animal mammary carcinogenesis. However, on the basis of immunohistochemical investigations, there are no definitive and concordant results on possible analogies between protein expression in the canine and human species, and on the correlation of HER-2 with clinical course of neoplastic disease. We report a study on HER-2 expression in canine mammary tissues by using an immunohistochemical procedure (HERCEPTEST[®], DAKO), performed in human medicine, and an immunohistochemical method which uses the same primary polyclonal antibody but a different detection system. N. 20 healthy mammary tissues, n. 9 hyperplastic, n. 11 benign, and n. 27 malignant mammary lesions have been investigated. As a comparison, n. 4 human mammary sections have also been included. The expression of HER-2 has been evaluated according the HERCEPTEST[®] scoring guidelines and also according to the scoring systems already published. Moreover, the expression of the receptor has also been correlated to clinical parameters. At present, quantification of HER-2 expression may be affected by the immunohistochemical method, by the scoring system used ad by the population sampled. In contrast wuth human breast cancer, HER-2 over-expression does not seem to identify a subgroup of tumours with a poorer prognosis.

Key words: HER-2 receptor, mammary cancer, immunohistochemistry

ESPRESSIONE DI HER-2 NELLA GHIANDOLA MAMMARIA DEL GATTO: ASPETTI TECNICI E CONFRONTO CON ESPRESSIONE DI P53 E KI67

Rasotto Roberta, Caliarì Diego, Zappulli Valentina, Bargelloni Luca, Castagnaro Massimo

Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata ed Igiene Veterinaria. Facoltà di Medicina Veterinaria. Università di Padova.

Nel 10-34% dei tumori maligni al seno della donna si rileva una sovraespressione dell'oncogene Her-2, importante indicatore prognostico e terapeutico. In questo studio è stata indagata l'espressione immunohistochimica della proteina Her-2 in 73 carcinomi mammari felini (FMCs), in 10 adenomi e in 73 lesioni iperplastico/displastiche mediante impiego dell'anticorpo policlonale approvato dalla FDA (Dakocytomation A0485); tale espressione è stata confrontata con quella delle proteine Ki67 e p53. La percentuale di FMCs positivi per Her-2 è risultata più bassa (4%) rispetto a quanto riportato in altri studi e non si sono evidenziate differenze significative fra lesioni iperplastiche e neoplastiche; l'espressione è stata inoltre rilevata a livello del tessuto mammario sano/displastico. In aggiunta, non sono emerse correlazioni significative fra l'espressione di Her-2 e di p53, sebbene quest'ultima proteina sia risultata positivamente correlata a Ki67. In un gruppo dei FMCs impiegati nello studio sono stati inoltre testati due anticorpi monoclonali anti-Her-2, si sono messi a confronto protocolli immunohistochimici diversi e l'espressione di Her-2 è stata inoltre analizzata mediante real time RT-PCR. Dal confronto dei risultati è emerso che lo smascheramento antigenico e il tipo di anticorpo influenzano significativamente il punteggio di positività attribuito. I livelli di mRNA, sebbene indagati per un numero ristretto di campioni, non sono correlati al punteggio immunohistochimico. Questi risultati suggeriscono che, similmente a quanto riportato per il tumore al seno della donna, la scelta della tecnica e il protocollo specifico rivestono un ruolo importante nell'analisi dell'espressione di Her-2 nel gatto e che il significato di questo oncogene nelle lesioni mammarie feline deve essere ulteriormente approfondito.

Parole chiave: ghiandola mammaria, tumore, gatto, Her-2

HER-2 EXPRESSION IN FELINE MAMMARY GLAND: TECHNICAL ASPECTS AND COMPARISON WITH P53 AND KI67 EXPRESSION

HER-2 oncogene overexpression is detected in 10-34% human breast cancers and it is considered important both as prognostic indicator and as predictor of sensibility to therapies. In this paper, immunohistochemical evaluations of the feline HER-2 orthologue expression was performed with the FDA-approved pAb (Dakocytomation A0485) in 73 feline mammary carcinomas (FMCs), 10 adenomas and 73 hyperplastic/dysplastic associated lesions and compared with the expression of Ki-67 and p53. Percentage of Her-2 positive FMCs was lower (4%) than other studies, no significant difference between hyperplastic and neoplastic tissue was evidenced, and expression was detected also in dysplastic/normal mammary gland tissue. In addition, no significant correlation was found between Her-2 and p53 expression, while the latter showed a significant positive correlation with Ki-67. For a subset of FMCs two monoclonal anti-Her-2 antibodies were also tested, different immunohistochemical protocols were compared and Her-2 expression was also analysed by real time RT-PCR. Results were compared. Antigen retrieval and type of antibody significantly influenced score of positivity. Although assessed on a small subset of samples, mRNA levels were not correlated to the immunohistochemical scores. These results suggest that, similarly to HBCs, the choice of technique and the associated specific protocols play an important role in the analysis of Her-2 important expression, and that the role of this oncogene in feline mammary lesions needs to be elucidated.

Key words: mammary gland, tumor, cat, Her-2

EFFETTO DELLA RESTRIZIONE CALORICA SULLE MODIFICAZIONI EPATICHE LEGATE AI PROCESSI DI INVECCHIAMENTO NEL MODELLO ANIMALE KILLIFISH TURCHESE (*NOTHOBRANCHIUS FURZERI*, JUBB 1971)

Di Cicco Emiliano¹, Cellerino Alessandro², Terzibasi Eva², Renzoni Giacomo¹, Rossi Giacomo¹

1 - Department of Veterinary Science, Faculty of Veterinary Medicine, University of Camerino, Italy. 2 - FLI - Leibniz Institute for Age Research, Jena, Germany

Attualmente il Killifish Turchese è considerato il miglior modello animale per gli studi sull'invecchiamento. Questo pesce annuale, proveniente dall'Africa sud-orientale, possiede un comportamento estremamente adattativo verso i periodi di siccità: infatti l'aspettativa di vita media del *N. furzeri* è di appena 8-9 settimane, rendendo questa specie (più simile ai Vertebrati superiori rispetto a nematodi o moscerini della frutta) altamente funzionale per gli studi sull'invecchiamento. Finora sono stati analizzati tre procedimenti per modulare l'aspettativa di vita di questo pesce: la somministrazione di antiossidanti (es. resveratrolo), basse temperature di allevamento o restrizione calorica. Lo scopo del nostro studio è stato quello di valutare gli effetti della restrizione calorica sui processi d'invecchiamento a carico del fegato del *N. furzeri*. Per far ciò sono state prelevate porzioni epatiche da tre gruppi di pesci suddivisi per età, e da tre ceppi differenti (di supposta differente aspettativa di vita). Un gruppo è stato sottoposto a restrizione calorica. I campioni sono stati quindi analizzati tramite indagini morfopatologiche (H&E), istochimiche (lipofuscine) ed immunoistochimiche (Bcl-2, p53 e PCNA), nonché tramite metodica TUNEL. I risultati hanno dimostrato che il gruppo sottoposto a restrizione calorica mostrava una minore prevalenza e gravità di fenomeni degenerativi epatici e di tumori, questi ultimi spesso legati ad una alterazione del turn-over cellulare. Ciò permette quindi di ipotizzare un'aspettativa di vita superiore nei soggetti trattati rispetto a quelli del gruppo di controllo. Da sottolineare inoltre che le lesioni sono sembrate correlare con l'età degli animali e con il ceppo, anche se per alcuni markers l'espressione immunoistochimica non è variata in modo statisticamente significativo tra i ceppi.

Parole chiave: *Nothobranchius furzeri*, restrizione calorica, processi d'invecchiamento, fegato

EFFECTS OF CALORIC RESTRICTION ON AGING PROCESSES IN LIVER OF TURQUOISE KILLIFISH (*NOTHOBRANCHIUS FURZERI*, JUBB 1971)

Currently the Turquoise Killifish is considered the best animal model suitable for aging studies. This annual fish, from south east Africa, shows an exceptionally adaptive behaviour to dry periods: in fact, the average lifespan of *N. furzeri* is just about 8-9 weeks, making this species (more similar to higher vertebrates than nematodes or fruit flies) highly practical for aging studies. To date, three ways to modulate the lifespan of this fish have been analyzed: addiction with antioxidants (i.e. resveratrol), low keeping temperature or caloric restriction. The present study has evaluated the effects of caloric restriction on aging processes in liver of *N. furzeri*. In order to do that, liver portions from three age groups and three different strains (with different expected lifespan) were collected. One group of fish underwent a caloric restriction. The samples were analyzed by morphological (H&E), histochemical (lipofuscins), immunohistochemical (Bcl-2, p53 and PCNA) examination, and T.U.N.E.L. method. The results demonstrated that caloric restriction group showed a lower incidence and severity of hepatic degeneration and neoplasms, due to the increase of cellular turn-over, and hence a longer lifespan was expected in comparison to control group. Furthermore the severity of lesions looked to be correlated with the age of the groups and the different strains, even though the expression of some markers didn't differ significantly between the strains themselves.

Key words: *Nothobranchius furzeri*, caloric restriction, aging process, liver

UTILITÀ DELLA CALRETININA QUALE MARKER IMMUNOISTOCHEMICO PER LO STUDIO DEI PNST DEI PESCI

Marino Fabio^{1,3}, Sfacteria Alessandra¹, Sferrazza Irene², Panebianco Antonio¹, Mazzullo Giuseppe¹

¹Dip. di Sanità Pubblica Veterinaria, Università degli Studi di Messina, Polo Universitario dell'Annunziata, 98168 Messin. ²ASL n. 6 Enna. ³Centro di Ittiopatologia Sperimentale della Sicilia (CISS) c/o Dip. di Sanità Pubblica Veterinaria, Università degli Studi di Messina

Considerato che l'uso della calretinina per diagnosticare lo schwannoma è diventato indispensabile in medicina, così come in ittiopatologia, di seguito riportiamo uno studio condotto su due tumori delle guaine mieliniche dei nervi periferici (PNST) spontaneamente occorsi in teleostei.

In un *Mugil cephalus*, il tumore era localizzato sulla testa e appariva come una massa nodulare appiattita, liscia e di consistenza soda, con una superficie di sezione omogenea, asciutta e biancastra. Istologicamente, il tessuto neoplastico appariva incapsulato e prevalentemente costituito da cellule allungate, con citoplasma pallido, fittamente stipate, arrangiate in fasci paralleli, senza caratteristiche palizzate nucleari, o vortici. L'immunoistochimica mostrava una evidente positività per l'S-100 e la vimentina, ma nessuna immunoreazione per la calretinina.

In un esemplare di *Sparus aurata*, la neoformazione appariva come una massa sottocutanea di aspetto nodulare, liscia e soda. Alla sezione la neoformazione, originante dal sottocute, mostrava limiti ben definiti ed appariva di aspetto omogeneo e di colore grigio-rosato. La neoformazione mostrava e originava dal sottocute. Istologicamente, il tumore appariva leggermente capsulato. La neoplasia era organizzata in fasci di tessuto tra i quali si repertava costantemente un notevole quantitativo di cellule adipose. Il tessuto tumorale era prevalentemente composto da cellule allungate, con citoplasma pallido, disposte in fasci paralleli formanti palizzate di nuclei. L'immunoistochimica mostrava una evidente positività per S-100 e calretinina.

Gli aspetti suesposti deponavano per la diagnosi di neurofibroma nel cefalo e di schwannoma nell'orata, confermando il ruolo della calretinina quale marker utile per distinguere le varianti inusuali di questi tumori anche nei pesci.

Parole chiave: schwannoma, neurofibroma, calretinina, teleostei, neoplasia

UTILITY OF CALRETININ AS IMMUNOHISTOCHEMICAL MARKER FOR THE STUDY OF FISH PNST

Calretinin has become an indispensable marker to distinguish schwannoma in both human medicine and fish pathology. Aim of this paper is to report the study results on two spontaneous PNST in teleosts.

In a *Mugil cephalus*, the tumour, located on the head, appeared as a firm, smooth, flattened nodular mass, with a whitish, dry, homogeneous cut surface. Histologically, the tumour was encapsulated and appeared to be composed of elongated densely packed cells showing pale cytoplasm, and sometimes arranged in parallel ranks, without distinctive nuclear palisades, or whorls. Immunohistochemistry showed a sharp S-100 and vimentin reaction, but no immunostaining was detected for calretinin.

In a *Sparus aurata* the tumour appeared as subcutaneous firm, smooth, nodular mass, with a pale grey to fairly pink, homogenous cut surface. The mass arose from subcutis and showed well defined limits. Histologically, it was slightly encapsulated and arranged in tissue bundles with interspersed several fat cells was always detected. Tumour tissue was composed of elongated cells, showing pale cytoplasm, arranged in parallel ranks with distinctive palisading of nuclei. Immunohistochemistry showed sharp S-100 and calretinin positivity.

The pathological findings were respectively consistent with the diagnoses of neurofibroma in the mullet and schwannoma in the gilthead seabream, confirming the role of calretinin as a useful marker to distinguish the unusual variants of these tumours also in fish.

Key words: schwannoma, neurofibroma, calretinin, teleosts, neoplasia

SHELL DISEASE SYNDROME IN *CARCINUS MEDITERRANEUS* (CZERNIAVSKY, 1884, CRUSTACEA, DECAPODA) ALLA FOCE DEL FIUME VOLTURNO (CE)

Carella F.^a, Maiolino P.^b, De Vico G.^a

^aDipartimento delle Scienze Biologiche, Facoltà delle Scienze MM.FF.NN, Università degli Studi di Napoli Federico II, via Mezzocannone, 8, 80134, Napoli. ^bDipartimento di Patologia e Sanità Animale, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli

In questo studio sono descritte le lesioni anatomo-istopatologiche osservate in crostacei decapodi della specie *Carcinus mediterraneus*, in corso di “*Shell disease syndrome*”. Cinquanta animali prelevati nella primavera del 2008 alla foce del fiume Volturno (CE) presentavano, a livello del carapace e degli arti, erosioni ed ulcere di colorito bruno-scuro o nero (black spot), di dimensioni e forma variabili, spesso ombelicate. L’esame istologico dell’esoscheletro evidenziava lesioni di diversa entità: erosioni epicuticolari che talvolta si estendevano all’endocuticola, fino a più estese e profonde ulcere, accompagnate da totale perdita della struttura esoscheletrica protettiva ed interessamento dell’epitelio sottostante, con formazione di pseudomembrane e infiltrati emocitari. A livello degli arti, e precisamente delle giunture, la lesione sembrava farsi strada tra le articolazioni, provocandone il successivo distacco o inducendo l’animale all’autotomia. Il termine “*Shell disease syndrome*”, descrive solitamente una condizione patologica che si manifesta più comunemente in crostacei che vivono in condizioni ambientali artificiali (come sistemi d’acquacoltura e acquari). Essa può essere tuttavia osservata anche in soggetti selvatici che vivono in acque inquinate ed estuari, in particolare laddove la carica batterica sia particolarmente elevata. Il riscontro di tale lesione in crostacei decapodi selvatici della foce del Volturno, area ad elevato tasso d’inquinamento organico ed inorganico, ci stimola ad approfondire le ricerche sulle relazioni causali tra patologia riscontrata e inquinazione ambientale, anche al fine di valutare la possibile utilità di tale sindrome nel monitoraggio degli ecosistemi acquatici.

Parole chiave: shell disease syndrome; istopatologia; biomonitor

SHELL DISEASE SYNDROME IN *CARCINUS MEDITERRANEUS* (CZERNIAVSKY, 1884, CRUSTACEA, DECAPODA) FROM VOLTURNO RIVER ESTUARY

In this study, the gross and histopathological lesions occurring in the shore crab (*Carcinus mediterraneus*), affected by the so-called *Shell disease syndrome*, are described. The affected animals, collected from the Volturno river estuary, showed erosive and ulcerative “black spot” lesions on the carapace and limb joints. Histologically the lesions ranged from mild erosion of the epicuticle and of the calcified endocuticle, to more extensive and severe total loss of the endocuticle and epidermis, with pseudomembrane formation and intense hemocyte infiltration. The detection of the syndrome in crabs from the polluted Volturno estuary, suggest the possible use of the disease in monitoring the health status of this aquatic environment.

Key words: shell disease syndrome; histopathology; biomonitor

DISPROPORZIONE CONGENITA DEL TIPO FIBRALE NEL PULEDRO: UNA NUOVA ENTITÀ PATOLOGICA

Paciello Orlando^a, Pasolini Maria Pia^b, Russo Alessandra^a, Potena Agostino^b, Trapani Francesca^a, Papparella Serenella^a

^aDipartimento di Patologia e Sanità animale – Settore di Anatomia Patologica. Università degli Studi di Napoli Federico II, via Delpino, 1, 80137 Napoli, Italia. ^bDipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie – Settore di Clinica Chirurgica. Università degli Studi di Napoli Federico II, via Delpino, 1, 80137 Napoli, Italia.

La disproporzione congenita del tipo fibrale rappresenta (CFTD), nel bambino, un disordine neuromuscolare, generalmente non progressivo a prognosi relativamente favorevole. I criteri per la diagnosi istopatologica si basano sulla presenza di fibre tipo 1 più piccole in diametro delle fibre tipo 2 di almeno il 12%, in assenza di altre anomalie strutturali del muscolo.

Il presente lavoro descrive le caratteristiche istopatologiche di campioni biotici di muscoli scheletrici prelevati da 5 puledri trottatori che presentavano debolezza muscolare e/o deformità flessorie, confrontate con quelle di campioni biotici muscolari di puledri della stessa razza, non affetti da patologie neuromuscolari. Campioni di muscolo gluteo medio sono stati congelati in isopentano preraffreddato in azoto liquido, e colorati con le metodiche istologiche ed istoenzimatiche routinariamente utilizzate nel nostro laboratorio. Nelle sezioni colorate per l'ATP-asi, le fibre tipo I e tipo II erano facilmente distinguibili. Le fibre tipo I erano più piccole di quelle tipo II (più del 12%) di dimensioni relativamente uniformi e costituivano il 9,8% (media) della popolazione fibrale totale, a fronte di un valore medio del 33,8%, osservato nei campioni biotici di controllo. Nelle sezioni colorate con le altre metodiche non sono state evidenziate altre lesioni. I reperti descritti sono compatibili con la disproporzione congenita del tipo fibrale.

In medicina umana la CFTD si caratterizza per la presenza di fibre tipo I di diametro inferiore, associate o meno ad una predominanza di fibre tipo I. Questa rappresenta la prima descrizione di CFTD in medicina veterinaria ed è interessante notare che nei puledri abbiamo osservato riduzione delle dimensioni delle fibre tipo I con predominanza di fibre tipo II. Questo reperto richiede ulteriori approfondimenti così come i fattori che condizionano la differenziazione del tipo fibrale nel cavallo.

Il dibattito sulla CFTD è tuttora aperto e si discute se essa vada considerata una entità patologica a sé stante o “una lesione patologica in cerca di una malattia”. L'estensione degli studi alla miologia veterinaria potrebbe aiutare a riempire questo gap.

(Supportato dal PRIN 2006 - Responsabile scientifico Serenella Papparella)

Parole chiave: Disproporzione del tipo fibrale, miopatia congenita, puledro.

CONGENITAL FIBER TYPE DISPROPORTION IN THE FOAL: A NEW PATHOLOGICAL ENTITY

Congenital myopathy with fiber type disproportion (CFTD) represents a recognizable, generally non progressive, neuromuscular disorder with a relative good prognosis. The pathological criterion for determining fiber type disproportion is the presence of type 1 fibers that are at least 12% smaller in diameter than type 2 fibers, in absence of any other structural and ultrastructural muscular abnormalities.

In this report, we describe the histopathological findings of skeletal muscle of 5 standardbred foals, clinically affected by muscle weakness and/or flexural deformities, compared with muscle from 3 normal standardbred. Muscle samples obtained from the gluteus medius muscle were studied, based on our routinely-performed extensive laboratory techniques. In the sections stained for ATP-ase, the type I and type II fibers were promptly distinguished. The type I fibers were smaller than type II (more than 12%), relatively uniform in size and represented 9,8% (mean) of the fiber population (in normal control they were 33,8%). No other pathological changes were evidenced with the different used stains. These findings were consistent with muscle fiber type disproportion.

In human medicine, CFTD is characterized by type I fibers smallness, associated or not to type I fiber predominance. Interestingly, in the foals we observed type I fibers smallness but associated to type II predominance. This finding have to be elucidated as well as the factors conditioning fiber type differentiation in horse.

Key words: fiber type disproportion, congenital myopathy, foal

This is the first description of this pathological entity in veterinary medicine, whether CFTD is a disease entity or a “pathology in search of a disease” is still debated on and veterinary myology could help to fill this gap. (Supported by grant: to SP from the PRIN 2006)

Key words: fiber type disproportion, congenital myopathy, foal

LE CELLULE INTERSTIZIALI DI CAJAL NELL'INTESTINO DI CAVALLO: STUDIO MORFOQUANTITATIVO IN CAVALLI NORMALI E IN CAVALLI COLICI

Pavone Silvia, Ricci Giovanni, Vitellozzi Giovanni, Mandara Maria Teresa

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

Le cellule interstiziali di Cajal (ICC) giocano un ruolo fondamentale nel controllo della motilità intestinale e risultano coinvolte in patologie dell'uomo e del cavallo legate ad alterazioni dell'attività motoria intestinale. Ad oggi nel cavallo non se ne conosce il reale modello di distribuzione e la loro rappresentazione numerica nel fisiologico.

In questo studio abbiamo indagato la distribuzione e la densità delle ICC nell'intestino del cavallo normale, in tutti i segmenti intestinali, in 5 soggetti di età compresa tra 8 mesi e 10 anni. Successivamente, la densità delle ICC è stata indagata in campioni biotici provenienti dalla flessura pelvica di 9 cavalli colici affetti da cambiamenti di posizione del grosso intestino. Tale indagine è stata condotta mediante valutazione immunostochimica del c-Kit (anti-human CD117 polyclonal rabbit antibody), notoriamente espresso dalle ICC. I rilievi così ottenuti sono stati sottoposti ad una valutazione quantitativa mediante analisi di immagine (NIS-Elements Br-2, Nikon).

La distribuzione e la densità delle ICC sono apparse solo in parte in accordo con i dati esistenti in bibliografia; in particolare, quelle presenti nella flessura pelvica sono risultate quantitativamente inferiori sia rispetto al piccolo intestino che al restante grosso intestino. Inoltre, è emersa una diminuzione delle ICC statisticamente significativa ($P \leq 0,05$) nella flessura pelvica campionata nei cavalli colici, apparentemente non correlata alla durata della sintomatologia colica. Resta da chiarire se la diminuzione delle ICC rappresenti per coliche da alterata motilità intestinale l'effetto piuttosto che la causa favorente. Alla luce dei risultati ottenuti, la valutazione della densità delle ICC, in campioni biotici intestinali della flessura pelvica, sembra costituire un parametro potenzialmente significativo nell'interpretazione prognostica delle lesioni intestinali, in associazione ad altri parametri morfofunzionali del SNE.

Parole chiave: Interstitial cells of Cajal (ICC), cavallo, colica, grosso intestino, c-kit.

INTERSTITIAL CELLS OF CAJAL (ICC) IN EQUINE INTESTINE: A MORPHOQUANTITATIVE STUDY IN NORMAL AND COLIC HORSES.

ICC play a key role in the intestinal motility control system so much so that they have been implicated in human and equine dysmotility syndromes. Up to now, the exact patterns of distribution and number of these cells are still unknown in health horses.

We investigated the distribution and rate of ICC in normal equine intestine coming from 5 horses. Subsequently, ICC rate was determined in biopsy samples coming from pelvic flexure of nine colic horses affected by Large Colon Accident (LCA).

The identification of ICC was performed with IHC method using an anti-human CD117 polyclonal rabbit antibody against c-Kit, expressed by these cells. The results were submitted to a semi-quantitative evaluation performed by image analysis.

In our study the distribution and rate of ICC appeared to be partially in agreement on previous reported data. It was showed a significant decreasing of ICC rate ($p \leq 0,05$) in biopsy samples coming from colic horses. Nevertheless, this finding was not significantly related to the clinic course. Further investigation is required to determine whether the ICC number decreasing is the effect or the cause of dysmotility syndrome. However, the rate of ICC quantified in the pelvic flexure could play an important role in the biptic evaluation of gut lesions, when examined with other morphofunctional markers of ENS.

Key words: Interstitial cells of Cajal (ICC), horse, colic, gross intestine, c-kit.

MORFOPATOLOGIA TIROIDEA IN CAVALLI DELL'EST EUROPA

Perillo Antonella^a, Paciello Orlando^b, Tinelli Antonella^a, Losacco Caterina^a, Passantino Giuseppe^a, Russo Valeria^b, Roperto Franco^b

^aDipartimento di Sanità e Benessere degli Animali – Settore di Anatomia Patologica. Facoltà di Medicina Veterinaria di Bari. ^bDipartimento di Patologia e Sanità animale – Settore di Anatomia Patologica. Università degli Studi di Napoli Federico II, via Delpino, 1, 80137 Napoli, Italia

I tumori della tiroide del cavallo sono considerati “moderatamente comuni” ed il più delle volte associati all'età avanzata (Capen, 1993, 2002, Dalefield and Palmer, 1994).

Nel cavallo la scarsità di studi epidemiologici sull'incidenza e prevalenza delle lesioni tiroidee non permette di conoscere l'esatta percentuale di tumori in questa specie.

Per questo motivo, e nel tentativo in prospettiva di meglio capire i pathways molecolari, abbiamo ritenuto interessante iniziare uno studio volto ad indagare i pattern morfologici, microscopici e submicroscopici e gli aspetti molecolari di lesioni neoplastiche tiroidee in cavalli importati dall'Est Europa, partendo dal presupposto, in analogia con la medicina umana, che il fallout ambientale possa, anche nei cavalli, giocare un ruolo importante nel determinismo di eventi neoplastici. Riportiamo la morfopatologia tiroidea riscontrata su 100 cavalli, di entrambi i sessi, di età media compresa tra 2 e 10 anni, provenienti dall' Est Europeo (Bielorussia, Bulgaria, Polonia, Romania, Russia, Slovacchia, Ucraina). I risultati dello studio morfologico condotto sono stati i seguenti: 15% tiroide normale, 20% adenomatosi interfollicolare, 15% proliferazione intrafollicolare, 5% gozzo colloide, 25% adenoma follicolare, 6% adenocarcinoma follicolare, 10% carcinoma follicolare compatto, 3% adenoma a cellule C, 1% carcinoma a cellule C. Da questi risultati, comunque preliminari, sembra che le lesioni neoplastiche siano particolarmente frequenti in cavalli dell'Est Europa.

Parole chiavi: tiroidi, tumori tiroidei, cavalli, isotopi radioattivi

MORPHOLOGICAL STUDY OF THYROID GLAND IN HORSES FROM EASTERN EUROPE

Thyroid tumours in horses are considered “moderately common”, and often are reported to be a common age-related abnormality (Capen, 1993, 2002; Dalefield and Palmer, 1994). Knowledge of thyroid tumours in horses, unlike that in some other species, is still very poor. To overcome the shortage of accurate data for these animals, we investigated thyroid from horses lived in Eastern Europe. We studied thyroid glands from 100 horses (age range 2 to 10 yrs) regularly slaughter in slaughter-houses near Bari. A morphological study on 100 thyroid glands was performed and the date carried out are the follows: 15% normal; 20% interfollicular adenomatosis, 15% intrafollicular proliferation, 5% collid goiter, 25% follicular cell adenomas, 6% follicular adenocarcinomas, 10% follicular cell carcinomas, 3% C-cell adenomas and 1% C-cell carcinomas. On the basis of these results it was concluded that the high incidence of thyroid tumours is in discordance with previous studies. Whereas the provenance of our horses, East Europe, where the incidence of thyroid tumours in human is very high, we consider a common etiopathogenesis in human and horse.

Whether or not the high number of thyroid tumours in horses are the consequences of an environmental fallout remain to be elucidated and are challenges for future study.

Key words: thyroid, thyroid tumours, horses, iodine isotopes

IL PAPILOMAVIRUS TIPO 2 NEL SANGUE DI BOVINI AFFETTI DA TUMORI VESCICALI

Brun R.¹, Borzacchiello G.¹, Roperto S.¹, Russo V.¹, Urraro C.¹, Venuti A.², Roperto F.¹

¹*Dipartimento di Patologia e Sanità Animale Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Napoli "Federico II", Napoli, Italia;* ²*Laboratorio di Virologia, Regina Elena, Roma, Italia;*

Nella cancerogenesi della vescica bovina, un ruolo centrale viene svolto dal papillomavirus tipo 2 il quale sembra agire in sinergia con alcune sostanze cancerogene presenti nella felce, la più importante delle quali è un sesquiterpenoide conosciuto come Ptaquiloside. A tutt'oggi non si conoscono le modalità attraverso le quali il virus giunge nella vescica così come il ruolo svolto dal sangue nella diffusione e localizzazione tissutale del virus stesso.

Il nostro studio riporta la presenza del virus nel torrente circolatorio di 61 animali su 78 affetti da tumore della vescica. L'esame anatomico-patologico ha permesso di evidenziare lesioni neoplastiche della vescica in 50 animali macellati.

BPV-2 DNA è stato amplificato e sequenziato in 37 campioni di sangue e di vescica dello stesso animale. Inoltre, E5 è stata evidenziata nel torrente circolatorio attraverso Western blotting in 13/15 animali esaminati. L'ulteriore presenza nel sangue della E2 fa ritenere che il virus sia circolante allo stato episomale.

Il meccanismo di infezione virale è tutt'ora oggetto di discussione. Noi riteniamo che il virus nel sangue sia secondario, almeno in parte, all'infezione virale della vescica. E' altrettanto verosimile, però, che il virus possa utilizzare il sangue come una delle vie da seguire per raggiungere la vescica. La presenza di E5 nel sangue fa pensare che il virus sia già attivo nel torrente circolatorio.

Parole chiave: papillomavirus bovino tipo 2/bovino/vescica urinaria/proteina E5

BOVINE PAPILOMAVIRUS TYPE 2 IN THE BLOOD OF CATTLE SUFFERING FROM TUMOURS OF THE URINARY BLADDER

Bovine papillomavirus type 2 infection has been associated with urinary bladder tumours in adult cattle grazing on bracken-fern lands. In this study we investigated the simultaneous presence of BPV-2 in whole blood and urinary bladder tumours of adult cattle in attempt to understand the biological role of circulating BPV DNA.

Peripheral blood samples were collected from 78 cattle with chronic enzootic hematuria caused by primary bladder tumours.

BPV-2 DNA was amplified and in 37 of urinary bladder tumours sample and blood samples of the same animal. Simultaneous presence of BPV-2 DNA in some bladders and blood samples may be indicative of viral infection of urinary bladder via blood-stream; alternatively, BPV-2 DNA in circulating blood may originate in neoplastic bladders.

Key words: bovine papillomavirus tipo 2/cattle/urinary bladder/E5 protein

PrP^{Sc} NEL SISTEMA OLFATTIVO DI PECORE AFFETTE DA SCRAPIE NATURALE

Corona Cristiano, Porcario Chiara, Martucci Francesca, Iulini Barbara, Manea Barbara, Mazza Maria, Palmitessa Claudia, Gallo Marina, Caramelli Maria, Casalone Cristina

CEA, Area Neuroscienze e Genetica, Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino

Recenti esperimenti evidenziano il coinvolgimento del sistema olfattivo (SO) nelle encefalopatie spongiformi: in criceti infettati per via intracerebrale la proteina prionica è stata rinvenuta in mucosa nasale; altri studi hanno dimostrato anche il ruolo delle fibre olfattive nella neuroinvasione da parte dei prioni.

Questo studio valuta il SO in corso di infezione naturale da scrapie. Campioni di mucosa nasale prelevati a livello di etmoturbinati, conca nasale ventrale e setto nasale da 24 pecore con scrapie naturale sono stati esaminati mediante immunistochemica (IHC), immunofluorescenza e western blot (WB) per la presenza di proteina prionica (PrP^{Sc}). La deposizione di PrP^{Sc} è stata anche valutata mediante IHC sulle aree encefaliche in relazione col SO (bulbo e tratto olfattivo, corteccia frontale, lobo piriforme e ippocampo).

La distribuzione di PrP^{Sc} è apparsa nel SO sia a livello periferico che centrale. L'esame WB ha riscontrato come positivi 21 campioni di mucosa olfattiva; in 16 di questi anche l'esame IHC ha confermato la positività. La deposizione di PrP^{Sc} è apparsa negli etmoturbinati, a livello del perinevrio dei nervi olfattivi, ma anche nel tessuto linfatico associato alla mucosa nasale; in nessun caso è stata rinvenuta in neuroni e fibre olfattive. Nel cervello una intensa deposizione di PrP^{Sc} si è rilevata in bulbo olfattivo e corteccia frontale, con pattern di tipo submeningeo, subependimale e perivascolare.

La presenza di PrP^{Sc} sia nelle aree cerebrali a diretto contatto con il liquor che nel perinevrio dei nervi olfattivi, a ridosso dell'estensione dello spazio subdurale che ne circonda le radici, supporta la recente scoperta della presenza di PrP^{Sc} nel liquido cefalo-rachidiano.

Parole chiave: pecora, scrapie, sistema olfattivo, PrP^{Sc}, perinevrio

PrP^{Sc} DETECTION IN THE OLFATORY SYSTEM OF SHEEP AFFECTED BY NATURAL SCRAPIE

The olfactory system (OS) involvement in transmissible spongiform encephalopathies has lately been acknowledged in experimental studies: prion spread to the nasal mucosa is known to occur in hamsters after intracerebral challenge, and olfactory neurons have been assessed as a route for prion neuroinvasion too. This study investigated whether the OS is involved in naturally occurring prion diseases.

Samples of nasal mucosa taken at the level of ethmoturbinates, ventral nasal concha and nasal septum from 24 natural scrapie affected sheep were examined by immunohistochemistry (IHC), immunofluorescence and western blot (WB) for scrapie prion protein (PrP^{Sc}).

OS related brain areas of the selected sheep (olfactory bulb, olfactory tract, frontal cortex, pyriform lobe and hippocampus) were analyzed too.

Prion spread was assessed both in peripheral and central OS of the examined sheep. Twenty one samples of olfactory mucosa were positive by WB; IHC confirmed WB positive results in 16 cases. PrP^{Sc} was mainly localized at ethmoturbinates in the olfactory nerve perineurium, and it was also disclosed in the nasal associated lymphoid tissue. It was never detected in olfactory neurons and fibers. In the brain PrP^{Sc} staining intensity was higher in olfactory bulb and frontal cortex, where it appeared as submeningeal, subependymal and perivascular patterns.

The finding of PrP^{Sc} both in the brain areas directly in contact to the cerebrospinal fluid (CSF) and in the olfactory nerve perineurium bounding the subdural space extension that surrounds nerve rootlets might be consistent with the recently discovered PrP^{Sc} presence in CSF.

Key words: sheep, scrapie, olfactory system, PrP^{Sc}, perineurium

DIAGNOSI DI CONFERMA MEDIANTE ESAME IMMUNOISTOCHEMICO SU CASI DI BSE CLASSICA, L-TYPE E H-TYPE: CONFRONTO FRA LA METODICA ITALIANA ED AMERICANA

Porcario Chiara¹, Hall Mark², Corona Cristiano¹, Iulini Barbara¹, Gazzuola Paola¹, Lund Sharon², Caramelli Maria¹, Richt Juergen³, Casalone Cristina¹

¹CEA, Area Neuroscienze e Genetica, Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino. ²APHIS, National Veterinary Service Laboratories, Ames, Iowa (USA).
³ARS-USDA, National Animal Disease Center, Ames, Iowa (USA)

La sorveglianza per l'encefalopatia spongiforme bovina (BSE) ha consentito di rilevare l'esistenza di tre forme della malattia, definite come BSE classica, Low (L) e High (H) type. In Italia su 141 casi confermati di BSE 3 appartengono alla variante, denominata BASE, riconducibile alla forma L-type. Negli Stati Uniti invece si sono riscontrati 3 casi di BSE: una forma classica (in un animale importato dal Canada) e 2 varianti H-type (autoctone). Obiettivo del presente studio è stato quello di confrontare i protocolli di immunistochemica italiano ed americano per la diagnosi di conferma di BSE, testando con entrambi i metodi sezioni seriali di obex di un caso italiano e del caso americano di BSE classica, e di un caso H-type americano e di uno L-type italiano (BASE). Secondo il protocollo italiano le sezioni, reidratate, vengono immerse in acido formico per 25 minuti e poi sottoposte ad autoclave a 121°C. La proteina prionica (PrP^{Sc}) è marcata con l'anticorpo primario F99/97.6.1, e la reazione visualizzata con il sistema avidina-biotina-perossidasi. Il protocollo americano prevede invece un trattamento in acido formico per 5 minuti, smascheramento in pentola a pressione e prosecuzione della procedura nel coloratore automatico Ventana NexES. Applicato l'anticorpo primario F99/97.6.1, la rivelazione viene effettuata mediante fosfatasi alcalina. Sia il protocollo italiano sia quello americano hanno riscontrato la presenza di PrP^{Sc} in tutti i casi esaminati. Le due metodiche sono risultate concordanti in merito sia alla distribuzione topografica che al pattern e all'intensità di deposizione della PrP^{Sc}. Tuttavia il protocollo italiano ha evidenziato sul caso H-type un maggiore accumulo di PrP^{Sc} intraneuronale.

Parole chiave: BSE, BASE, PrP^{Sc}, immunistochemica, pattern

COMPARING ITALIAN AND UNITED STATES CONFIRMATORY BSE PROTOCOLS IN THE DETECTION OF CLASSICAL, HIGH AND LOW MOLECULAR WEIGHT BSE CASES

Ongoing surveillance systems for bovine spongiform encephalopathy (BSE) led to the identification of three distinct forms of the disease: Classical (C), Low (L) or High (H) type BSE. At present in Italy out of 141 confirmed BSE cases 3 have been ascribed to a new BSE variant, named BASE, belonging to the L-type group. In the U.S. a total of 3 cases, one of C-BSE (in an imported cow from Canada) and 2 H-type cases (both U.S. born) have been recognized to date. Aim of the present study was to compare Italian and U.S. immunohistochemical (IHC) confirmatory BSE protocols by testing serial obex sections from the U.S. C-BSE case, an Italian C-BSE case, an H-type U.S. case and an L-type Italian (BASE) case with both methods. According to the Italian protocol to detect pathological prion protein (PrP^{Sc}) dewaxed tissue sections are formic acid treated for 25 minutes and then undergo hydrated autoclaving at 121° C. Primary antibody F99/97.6.1 is applied and the reaction visualized by the avidin biotin peroxidase complex. The U.S. IHC procedure uses formic acid treatment for 5 minutes, demasking in decloaking chamber and automated staining on the Ventana NexES carousel. The primary antibody employed is F99/97.6.1 and alkaline phosphatase is used as detection reagent. Both the Italian and the U.S. IHC procedures detected PrP^{Sc} presence in all the examined cases. The two techniques were similar in terms of detecting the PrP^{Sc} distribution and deposition pattern as well as the intensity of staining. Although, the H-type BSE case using the Italian IHC protocol revealed a higher amount of intraneuronal PrP^{Sc} deposition.

Key words: BSE, BASE, PrP^{Sc}, immunohistochemistry, pattern

ESPRESSIONE GENICA DI LT α e LT β IN ORGANI DI OVINI CON DIFFERENTI QUADRI LESIVI LINFOPROLIFERATIVI DA VIRUS MAEDI-VISNA

¹Cancedda Giovanna Maria, ¹Maestrale Caterina, ¹Galistu Adriana, ¹Attene Sonia, ¹Demontis Francesca, ¹Macciocu Simona, ²Carta Antonello, ¹Santucci Cinzia, ¹Denti Stefano, ¹Saba Mariangela, ¹Crudeli Silvia, ^{1*}Ligios Ciriaco

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, “G. Pegreffi” – Sassari. ²AGRIS, Dipartimento per la ricerca nelle produzioni animali – Olmedo

Il virus Maedi-Visna (VMV) provoca nel polmone, mammella ed articolazioni di pecora lesioni infiammatorie linfoproliferative con infiltrato linfocitario diffuso od organizzato in follicoli (infiammazione linfofollicolare) mediante un meccanismo patogenetico sinora scarsamente conosciuto. Scopo del presente lavoro è quello di contribuire alla conoscenza di tale meccanismo quantificando l'espressione genica di Linfotossina α (LT α) e Linfotossina β (LT β) in organi di pecore infettate sperimentalmente con VMV. Allo scopo 30 agnelli di razza Sarda sono stati inoculati, all'età media di 20 giorni, per via endovenosa e per via intra-tracheale con il ceppo 83/34PP di VMV. A circa due anni di età, 14 dei 30 agnelli sono stati sacrificati ed esami istologici ed immunoistochimici sono stati eseguiti su polmone, mammella e linfonodi sopramammari per la caratterizzazione delle lesioni.

Nove su 14 (64,2%) capi hanno presentato una mastite riferibile a VMV, mentre solo 1 su 14 (7,14%) ha mostrato la tipica polmonite linfoproliferativa. Successivamente, in questi campioni è stata quantificata l'espressione di LT α e LT β mediante la tecnica di quantificazione relativa in Real-Time PCR su cDNA retrotrascritto da mRNA totale, normalizzato con il gene 18S umano.

L'aumento dell'espressione dei geni per LT α e LT β era evidente in mammelle con infiltrati infiammatori di tipo linfo-follicolare quando comparate a mammelle nelle quali era presente un semplice infiltrato linfocitario.

Nell'unico polmone con la caratteristica polmonite linfo-follicolare il livello di mRNA specifici per LT α e LT β è risultato superiore rispetto ai controlli.

Questi risultati dimostrano che LT α e LT β giocano un ruolo importante nella neogenesi delle tipiche strutture linfofollicolari indotte da VMV.

Parole chiave: Visna-Maedi, LT α , LT β , ovino

LT α AND LT β GENE EXPRESSION IN ORGANS OF SHEEP SHOWING DIFFERENT LYMPHOPROLIFERATIVE CHANGES INDUCED BY MAEDI-VISNA VIRUS

In lung and mammary gland of sheep, Maedi-Visna virus (MVV) causes lymphoproliferative inflammation often with follicular structures (lymphofollicular inflammation). The aim of this work was to define whether Lymphotoxin α and β (LT α , LT β) play a role in the formation of these peculiar lesions in sheep experimentally infected with MVV.

To do this, 30 Sarda breed lambs at 20 days of age were inoculated intravenously and intratracheally with 83/34PP MVV strain. Fourteen lambs were sacrificed at 24 months of age and then histological and immunohistochemical examinations were carried on lungs, mammary glands and mammary lymphonodes. Nine out of the 14 (64.2%) lambs displayed lymphoproliferative changes indicative of MVV infection in the mammary glands, while only one (7.14%) showed similar inflammatory changes in the lung.

The relative Real Time PCR quantification demonstrated that LT α and LT β gene expression was up-regulated in lungs and mammary glands displaying well definite lymphofollicular formations when compared with the mammary glands and lungs, in which only diffuse lymphoid infiltration were observed. These results demonstrate that LT α and LT β have a pivotal role in the formation and maintenance of the lymphoid follicles neogenerated during MVV infection.

Key words: Visna-Maedi, LT α , LT β , sheep

INDAGINI ISTOLOGICHE E CARATTERIZZAZIONE DELL'INFILTRATO INFIAMMATORIO NELL'INTESTINO TENUE DI CAPRE NATURALMENTE INFETTE DA TRICOSTRONGILI

Trapani Francesca^a, Inverso Donato^a, Rinaldi Laura^b, Veneziano Vincenzo^b, Maiolino Paola^a, Paciello Orlando^a, Cringoli Giuseppe^b, Papparella Serenella^a

Dipartimento di Patologia e Sanità animale – ^aSettore di Anatomia Patologica, ^bSettore di Parassitologia. Università degli Studi di Napoli Federico II, via Delpino, 1, 80137 Napoli, Italia

L'allevamento ovi-caprino riveste un importante ruolo nell'economia e la qualità e la quantità delle loro produzioni sono negativamente influenzate dalle parassitosi, soprattutto quelle da strongili gastrointestinali, per le quali gli attuali protocolli terapeutici e di profilassi non offrono una risposta risolutiva viste le scarse conoscenze sull'azione patogena di tali parassiti. Lo scopo di questo lavoro è quello di descrivere le lesioni istopatologiche dell'intestino tenue di animali naturalmente infestati da tricostrongili, e di caratterizzare l'infiltrato infiammatorio per analizzare la tipologia della risposta immunitaria. Sono stati effettuati prelievi di intestino tenue (duodeno, digiuno, ileo) provenienti da 12 capre allevate in Basilicata. Le sezioni allestite sono state colorate con Ematossilina/Eosina, Alcian blu Pas pH 2,5, Blu di Toluidina e con tecniche di immunistochemica (streptavidina-biotina perossidasi).

L'osservazione delle sezioni ha evidenziato flogosi generalmente marcata, con infiltrato prevalentemente linfocitario, che si estendeva dalla lamina propria all'asse dei villi, che risultavano più bassi, privi di enterociti e mostravano linfangectasia. Inoltre si osservavano lesioni a carattere iperplastico delle cripte ghiandolari nonché aspetti ipersecretivi. Tali secrezioni con la metodica Alcian blue-PAS pH 2.5 sono risultate prevalentemente alcianofile.

L'espressione di linfociti CD79, CD3, CD8 positivi dimostrano l'attivazione di una risposta Th1 e Th2. La ragione per cui un organismo sviluppa una risposta Th1 o Th2 dipende da diversi fattori quali un valore antigenico soglia e da fattori genetici individuali che conferiscono resistenza.

Gli studi sulla risposta immunitaria in corso di infestazioni parassitarie potrebbero assumere un ruolo importante non solo per mettere in evidenza i meccanismi di difesa attuati in tali patologie, ma anche per comprendere patologie gastrointestinali di diversa natura, con il fine di attuare nuove strategie immunologiche.

Parole chiave: Tricostrongili, intestino tenue, capre

HISTOPATHOLOGY AND IMMUNOHISTOCHEMICAL FINDINGS OF SMALL INTESTINE IN GOATS NATURALLY INFECTED BY TRICHOSTRONGYLOIDES

Sheep and goat breeding has a prominent role for the economy, however, their production is negatively affected by several factors including parasitic diseases, particularly gastrointestinal strongyle infection. Nowadays little is known about the pathogenesis and host response against nematode and few effective strategies of immunisation are developed. The aim of this work is to analyse the histopathological changes and the distribution of T and B lymphocytes in small intestine of goats naturally infected with trichostrongylus. Tissue sections were stained with haematoxylin and eosin, alcian blue pas pH 2,5, toluidine blue and streptavidin-biotin peroxidase complex method was used for immunohistochemistry. A heavy inflammatory infiltrate of lymphocytes was observed in the lamina propria and in the villi, moreover linphangectasia and goblet cells hyperplasia were observed.

CD79, CD3 and CD8 positive cells were observed with immunohistochemistry. These data could suggest an induction of Th1 and Th2 immune responses.

The reason why host mounts a Th1 or Th2 response it depends on several factors as a threshold levels that should stimulate a host immunity or genes implicated with resistance.

Understanding the mechanisms of altered physiology in nematode infections may lead to the development of new immunological strategies to combat intestinal infections and inflammatory conditions.

Key words: Trichostrongyloides, small intestine, goats .

L'ALPHA-1 GLICOPROTEINA ACIDA MODULA SELETTIVAMENTE LA DEGRANULAZIONE DEI NEUTROFILI BOVINI

Miranda-Ribera Alba¹, Lecchi Cristina¹, Bronzo Valerio¹, Scaccabarozzi Licia¹, Sartorelli Paola¹, Franciosi Federica², Cecilianì Fabrizio¹

¹Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Università degli Studi di Milano. ²Dipartimento di scienze animali, Università degli Studi di Milano

L'alpha 1-glicoproteina acida (AGP) è una proteina di fase acuta identificata sia nell'uomo sia in molte specie animali; è prodotta principalmente dal fegato, ma viene espressa a livello locale da innumerevoli tessuti. L'AGP è in grado non solo di legare e trasportare numerose molecole idrofobiche, ma anche di svolgere un'attività immunomodulatoria sui leucociti. È stato dimostrato che la AGP bovina modula diverse funzioni di monociti e di granulociti, riducendo in vitro l'apoptosi e la chemotassi dei primi e l'aggregazione e la produzione di ROS dei secondi. Lo scopo di questo studio è stato valutare se la AGP esercita la sua azione immunomodulatoria a livello locale sulla esocitosi sia spontanea sia indotta dei granuli primari e secondari dei granulociti bovini.

Dopo aver verificato il legame tra AGP e membrana plasmatica dei granulociti mediante microscopia a fluorescenza, i granulociti sono stati stimolati con AGP a due concentrazioni (una simile a quella riscontrata in stati fisiologici, l'altra in stati di reazione sistemica) in presenza di ZAS o in assenza (degranulazione indotta o spontanea). La degranulazione è stata valutata quantificando il rilascio di mieloperossidasi, contenuta nei granuli primari, e di fosfatasi alcalina, presente in quelli secondari. Una serie successiva di esperimenti ha permesso di valutare se 1) la AGP svolga la sua azione come *binding protein*, sottraendo lo ZAS dal terreno di coltura, piuttosto che agendo come competitore dei recettori per lo ZAS; 2) l'attività biologica della proteina sia determinata dal suo pattern oligosaccaridico.

I risultati hanno dimostrato che la AGP, se presente a concentrazioni elevate, è in grado di modulare la degranulazione sia spontanea sia indotta dei granulociti e, in particolare, di svolgere un'azione protettiva riducendo la esocitosi dei granuli secondari. Nessun effetto è stato osservato sulla degranulazione dei primari.

I risultati della seconda serie di esperimenti mostrano una riduzione della degranulazione dei granuli secondari dopo pre-incubazione di ZAS con AGP a basse concentrazioni, mentre nessuna variazione è stata osservata dopo pre-incubazione dei granulociti con AGP. Inoltre l'azione della AGP è strettamente legata alla presenza di acido sialico, poiché la proteina desialilata non determina nessuna variazione dell'attività dei granulociti.

I nostri risultati confermano l'attività immunomodulatoria della AGP e dimostrano che essa è in grado di svolgere una azione finemente controllata sul rilascio dei granuli secondari da parte dei granulociti, mentre non esercita alcuna azione su quello dei primari.

Parole chiave: alfa-1-glicoproteina acida, neutrofili, degranulazione, infiammazione, immunomodulazione

INTRODUZIONE

L'immunocalina alpha 1-glicoproteina acida (AGP) svolge una attività immunomodulatoria partecipando alla regolazione dell'infiammazione sia sistemica sia locale [1]. Nel bovino la AGP è considerata una proteina di fase acuta minore, poichè in corso di infiammazione la sua concentrazione plasmatica aumenta da tre a cinque volte [4]. L'AGP ha un ruolo protettivo: riduce l'apoptosi [3] e, nel bovino, aumenta la vita media dei monociti [4]; modula la chemotassi dei neutrofili [5], l'aggregazione piastrinica e la generazione di specie reattive dell'ossigeno [6]. L'influenza dell'AGP sulla degranulazione dei neutrofili non è ancora stata studiata nè in medicina umana nè in medicina veterinaria. Questo studio mira a valutare se la AGP bovina sia in grado di esercitare una azione immunomodulatoria sulla esocitosi dei granuli primari e secondari dei neutrofili bovini. E' stata studiata la degranulazione dei neutrofili sia spontanea sia indotta da ZAS (Zymosan Activated Serum, in cui è presente il C5a) in presenza di AGP bovina. Inoltre, vista l'enorme importanza rivestita dall'acido sialico terminale della AGP [7], gli stessi esperimenti sono stati condotti in presenza di AGP desialilata.

MATERIALI E METODI

Reagenti

Il siero bovino è stato attivato con 15mg/ml di Zymosan A da *S.cerevisiae*.

Tutti gli esperimenti sono stati condotti usando AGP purificata [4]. Sono state usate due concentrazioni di AGP: una simile a quella fisiologica (0.3mg/ml) e una simile a quella riscontrata in corso di infiammazione (0.9mg/ml) [8]. I neutrofili sono stati isolati su gradiente di Percoll [9].

Immunocitochimica e studi relativi al legame AGP-neutrofili

Per verificare il legame tra AGP e membrana, i neutrofili sono stati stimolati per 30min con AGP 0.3mg/ml e 0.9mg/ml. Le cellule, fissate su un vetrino, sono state incubate con un anticorpo primario rabbit anti-bovine AGP [4] e poi con anticorpo secondario FITC anti-rabbit IgG. La cromatina è stata colorata con DAPI.

I campioni sono stati osservati con un microscopio a epifluorescenza convenzionale.

Studi di degranulazione

Disegno sperimentale per la stimolazione

Per studiare la degranulazione dei granuli primari e secondari, le cellule sono state incubate in diverse condizione e i surnatanti sono stati raccolti per la successiva quantificazione della esocitosi.

Per valutare i granuli primari, si è dosata l'attività enzimatica della mieloperossidasi (MPO) [10] e, per i secondari, quella della fosfatasi alcalina (ALK-P) [11].

I risultati sono stati espressi in percentuale di attività di ALK-P e di MPO rispetto al contenuto totale di enzima, determinato dalla incubazione dei neutrofili con 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB).

Esperimento1→ degranulazione spontanea: i neutrofili sono stati incubati in assenza (controllo negativo) o in presenza delle due concentrazioni di AGP. L'attività della MPO e ALK-P è stata dosata dopo 120' d'incubazione.

Esperimento2→ degranulazione indotta: i neutrofili sono stati incubati in assenza (controllo negativo) o in presenza delle due concentrazioni di AGP e con (controllo positivo) o senza (controllo negativo) ZAS. Per escludere una attivazione proteica non specifica, le cellule sono state incubate con albumina 0.9mg/ml. I surnatanti sono stati raccolti ogni 15 min per 2 ore dopo l'attivazione.

Esperimento3→ interazione AGP-membrana citoplasmatica: i neutrofili sono stati incubati con le due concentrazioni di AGP per 10'; la proteina non legata alla membrana è stata tolta mediante lavaggi e le cellule sono state stimolate con ZAS per 120'. L'attività della MPO e della ALK-P è stata misurata dopo 120'.

Esperimento4→ attività AGP desialilata (privata dell'acido sialico terminale): i neutrofili sono stati incubati con AGP, desialilata (as-AGP) mediante neuraminidase come previamente descritto [4], alle due concentrazioni con o senza ZAS. I controlli sono stati fatti usando parallelamente aliquote di AGP non desialilata. L'attività della MPO e della ALK-P, è stata misurata dopo 120'.

RISULTATI

L'AGP si lega alla membrana dei neutrofili.

La incubazione della AGP con i neutrofili determina una marcatura omogenea sulla superficie (fig. 1), che incrementa leggermente

quando le cellule sono incubate con concentrazione di AGP di fase acuta.

L'AGP modula la degranolazione spontanea.

Il trattamento dei neutrofili per 120' con AGP (0.9mg/ml) determina una diminuzione della degranolazione spontanea dei granuli secondari (fig2A), questo effetto non si osserva a concentrazione fisiologica. Una azione opposta si osserva sui granuli primari; infatti l'AGP alla concentrazione di 0.9mg/ml sembra indurre la degranolazione spontanea dei granuli primari (fig2B).

L'AGP modula la esocitosi indotta da ZAS dei granuli secondari.

Il rilascio dei granuli secondari dopo attivazione dei neutrofili con ZAS è ridotto in presenza di AGP (0.9mg/ml) (fig3A). L'esocitosi dei granuli primari non sembra influenzata dalla presenza di AGP (fig3B).

La pre-incubazione delle cellule con AGP inibisce l'esocitosi dei granuli secondari dei neutrofili attivati con ZAS.

La pre-incubazione dei neutrofili con AGP non ha nessun effetto sul rilascio dei granuli primari (fig4B), mentre si osserva una riduzione su quello dei granuli secondari in presenza di AGP a concentrazioni sia fisiologiche (riduzione non statisticamente significativa) sia di fase acuta dopo 120'.

Gli effetti dell'AGP sulla degranolazione sono correlati al suo contenuto in acido sialico.

L'incubazione dei neutrofili con AGP desialilata non ha mostrato alcuna modulazione della esocitosi dei granuli in presenza (fig5A) nè in assenza (fig6A, B) di ZAS.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I risultati riportati dimostrano che la proteina di fase acuta, α 1-glicoproteina acida, modula una delle funzioni più importanti nei neutrofili bovini, la mobilizzazione dei loro granuli. La degranolazione spontanea dei granuli secondari è ridotta in modo dose dipendente in presenza di AGP. E' possibile speculare che almeno questa modulazione sia finalizzata a prevenire una degranolazione precoce dei neutrofili presenti nel sangue. Il significato biologico della azione sui granuli primari deve ancora essere chiarito.

L'immunofluorescenza ha dimostrato che l'AGP si lega alla membrana dei neutrofili. Verosimilmente parte dell'attività dell'AGP è dovuta non solo alla sua attività di *binding*, ma anche alla interazione con la membrana cellulare. Dal momento che la preincubazione dei neutrofili con l'AGP riduce l'esocitosi dei granuli secondari, si può ipotizzare che l'AGP si leghi in modo competitivo al recettore per il C5a, il CD88. Ulteriori studi saranno condotti per determinare l'eventuale interazione della AGP con il CD88.

E' possibile ipotizzare che l'AGP si leghi anche ad altri recettori di membrana, attivando cascate intracellulari coinvolte nella riorganizzazione del citoscheletro, fondamentale per la mobilizzazione dei granuli. A supporto di questa ipotesi Gunnarsson et al [12] hanno dimostrato che l'AGP attiva la mobilizzazione del Ca^{2+} nei neutrofili umani.

Le attività modulatorie dell'AGP sono strettamente correlate al suo pattern oligosaccaridico e vengono meno in assenza degli acidi sialici terminali, come già dimostrato [4,13]. Questo dato risulta interessante considerando che il pattern oligosaccaridico della AGP cambia in corso di patologie.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Tilg H, Vannier E, Vachino G, Dinarello C, Mier JW. Anti-inflammatory 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* 1993; 178(5):1629-36.
- [2] Hocheleid T, Berger FG, Baumann H, Libert C. Alpha1-Acid glycoprotein: an acute phase protein with inflammatory and immunomodulating properties. *Cytokine Growth Factors Rev* 2003; 14(1):25-34.
- [3] Van Molle W, Libert C, Fiers W, Brouckaert P. Alpha 1-acid glycoprotein and alpha 1-antitrypsin inhibit TNF-induced but not anti-Fas-induced apoptosis of hepatocytes in mice. *J Immunol* 1997;159 (7):3555-64.
- [4] Cecilian F, Pocacqua V, Miranda-Ribera A, Bronzo V, Lecchi C, Sartorelli P. alpha(1)-Acid glycoprotein modulates apoptosis in bovine monocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 2007; 116(3-4):145-52.
- [5] Lainé E, Couderc R, Roch-Arveiller M, Vasson MP, Giroud JP, Raichvarg D. Modulation of human polymorphonuclear neutrophil

functions by alpha 1-acid glycoprotein. *Inflammation* 1990; 14(1): 1-9.

[6] Costello MJ, Gewurz H, Siegel JN. Inhibition of neutrophil activation of alpha₁-acid glycoprotein. *Clin Exp Immunol* 1984;55(2):465-72.

[7] Cecilian F, Pocacqua V. The acute phase protein alpha₁-acid glycoprotein: a model for altered glycosylation during diseases. *Curr Protein Pept Sci.* 2007;8(1):91-108.

[8] Tamura K, Yatsu T, Itoh H, Motoi Y. Isolation, characterization, and quantitative measurement of serum alpha 1-acid glycoprotein in cattle. *Nippon Juigaku Zasshi.* 1989;51(5):987-94.

[9] Rinaldi M, Moroni P, Paape MJ, Bannerman DD. Evaluation of assays for the measurement of

bovine neutrophil reactive oxygen species. *Vet Immunol Immunopathol* 2007; 115(1-2):107-25.

[10] Quade MJ, Roth JA. A rapid, direct assay to measure degranulation of bovine neutrophil primary granules. *Vet Immunol Immunopathol* 1997; 58(3-4):239-48.

[11] Rausch PG, Moore TG. Granule enzymes of polymorphonuclear neutrophils: A phylogenetic comparison. *Blood* 1975; 46(6):913-9.

[12] Gunnarsson P, Levander L, Pålsson P, Grenegård M. The acute-phase protein alpha 1-acid glycoprotein (AGP) induces rises in cytosolic Ca²⁺ in neutrophil granulocytes via sialic acid binding immunoglobulin-like lectins (siglecs). *FASEB J.* 2007; 21:4059-69.

[13] Costello M, Fiedel BA, Gewurz H. Inhibition of platelet aggregation by native and desialised alpha-1 acid glycoprotein. *Nature* 1979; 281(5733):677-8.

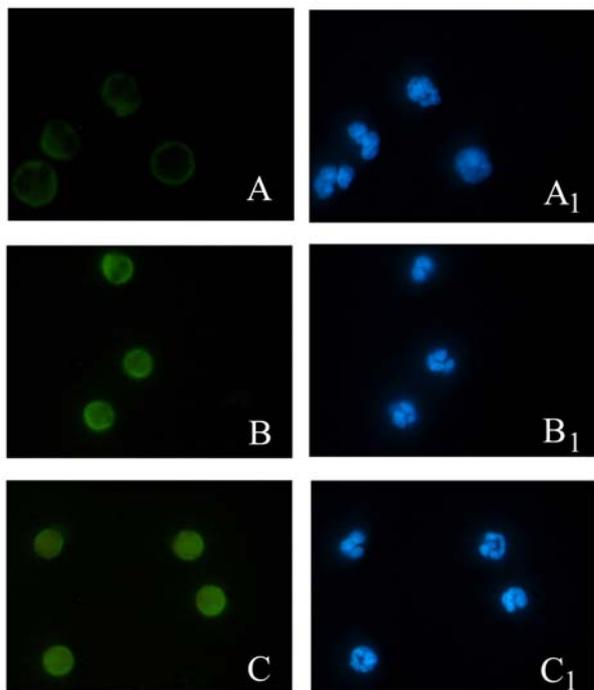


Fig. 1: legame dell'AGP alla membrana dei neutrofili. Controllo negativo: HBSS (A). AGP 0.3mg/ml (B) e AGP 0.9mg/ml (C). A1,B1 e C1:colorazione del nucleo con DAPI.

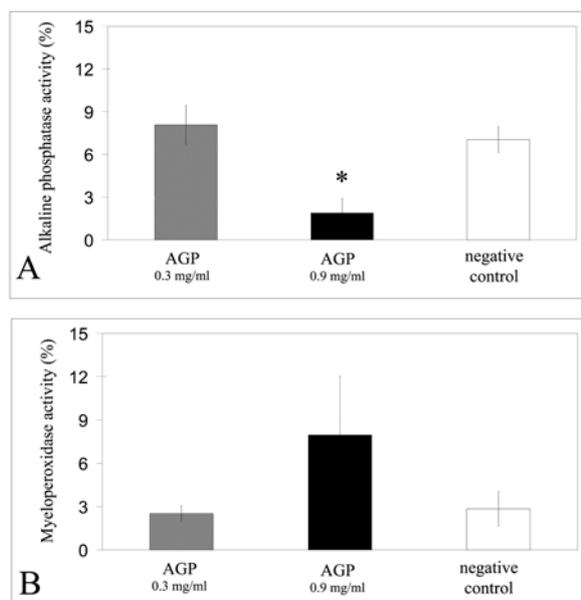


Fig. 2: effetti dell'AGP sulla degranulazione spontanea dei neutrofili. Dosaggio dell'attività enzimatica della ALK-P per i granuli secondari (A) e della MPO per i granuli primari (B).

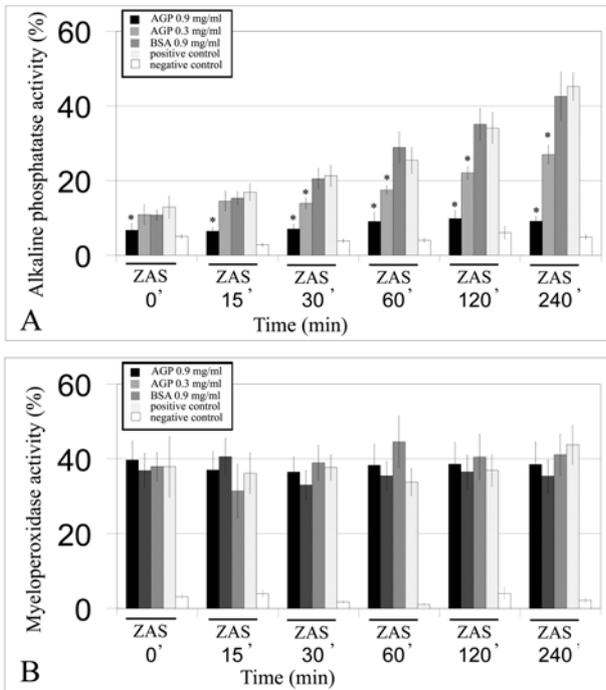


Fig. 3: effetto dell'AGP sull'esocitosi dei granuli secondari (A) e primari (B) nei neutrofili stimolati con ZAS.

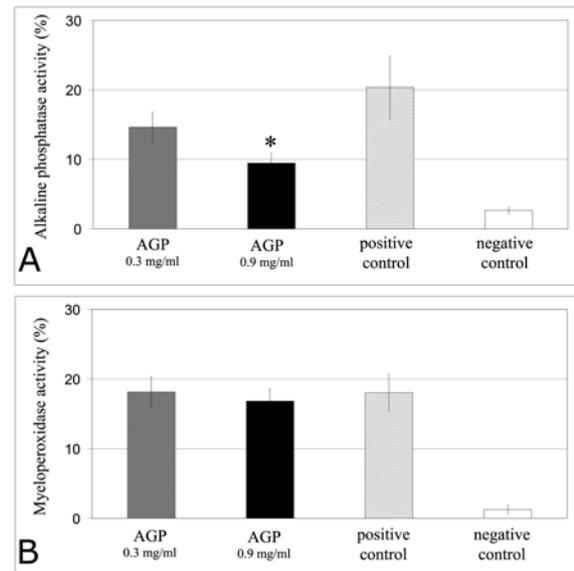


Fig. 4: effetto della preincubazione dei neutrofili con AGP sull'esocitosi dei granuli primari (B) e secondari (A).

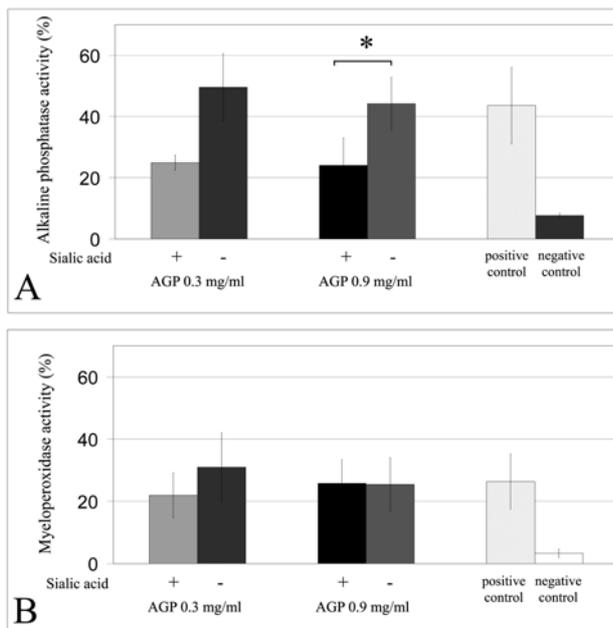


Fig. 5: effetti della dell'AGP desialilata sulla esocitosi dei granuli primari (B) e secondari (A) dei neutrofili stimolati con ZAS.

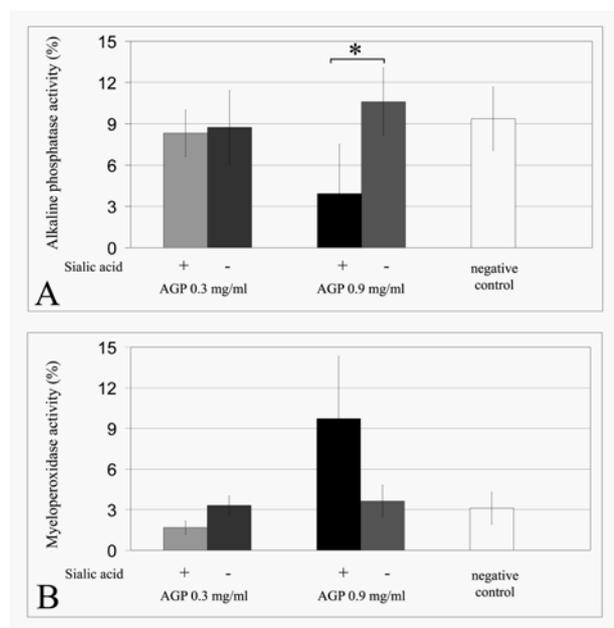


Fig. 6: effetti della desialilazione dell'AGP sulla degranulazione spontanea dei granuli primari (B) e secondari (A) dei neutrofili.

ALPHA1-ACID GLYCOPROTEIN SELECTIVELY MODULATES BOVINE NEUTROPHILS DEGRANULATION

Alpha-1-acid glycoprotein (AGP) behaves as an acute phase protein in many species; it is mainly synthesized by liver, but it can be locally expressed by several other tissues.

AGP can bind and transport several small hydrophobic molecules, meanwhile exerting immunomodulatory functions, in particular on leukocytes. AGP has been reported to influence monocytes apoptosis and chemotaxis and granulocytes aggregation and generation of ROS. The aim of this study was to investigate the possible activity of AGP on blood granulocytes exocytosis.

The binding of AGP to cellular membrane of granulocytes was demonstrated by fluorescence microscopy. Exocytosis of granulocytes was induced by incubation of isolated cells with two concentrations of AGP (similar to those found in physiological status or in systemic reaction) with or without ZAS (induced or spontaneous degranulation). Primary and secondary granules release was determined by measuring the enzymatic activity of myeloperoxidase and alkaline phosphatase. We found that AGP selectively reduce the release of secondary granules content in a dose-dependent manner, while no significantly modifications were observed on degranulation of primary granules.

We investigated also if AGP's activity was due to interaction with granulocytes membrane and if AGP was capable to bind ZAS. Results of both experiments were statistically not significant. We found that the exocytosis modulating activities of AGP were strongly related to its glycan moiety, since all of them were abolished by the removal of sialic acid.

Our results extended previous findings on the immunomodulatory activity of AGP and support the hypothesis that AGP influences the activities of bovine granulocytes by modulating the exocytosis of secondary granules content.

Key words: alpha1-acid glycoprotein, neutrophil, degranulation, inflammation, immunomodulation

E-CADERINA E BETA-CATENINA DOWN-EXPRESSION NELLE CELLULE TUBULARI EPITELIALI NELLE PATOLOGIE RENALI NEL CANE

Aresu Luca¹, Rastaldi Maria Pia², Pregel Paola¹, Valenza Federico¹, Radaelli Enrico³, Scanziani Eugenio³, Castagnaro Massimo⁴

¹Dipartimento di Patologia Animale, Università degli studi di Torino, Grugliasco (TO), Italy.

²Renal Immunopathology Laboratory, Fondazione D'Amico per la Ricerca sulle Malattie Renali, Milano, Italy³. Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Università degli Studi di Milano, Milano, Italy⁴. Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Agripolis, Padova, Italy

L'evoluzione della fibrosi che porta ad una condizione di insufficienza renale cronica è motivo di discussione ed interesse nella patologia umana. La patogenesi delle malattie renali croniche è caratterizzata dalla progressiva perdita dell'unità funzionale nefrone e da fibrosi. Diversi studi *in vitro* hanno dimostrato come il meccanismo di transizione epitelio-mesenchimale (EMT) sia implicato nei processi di fibrosi renale; recentemente abbiamo dimostrato la modificazione delle cellule epiteliali tubulari, con la perdita di espressione del *marker* epiteliale, citocheratina, e l'acquisizione *de novo* del *marker* mesenchimale, vimentina, nelle patologie infiammatorie renali.

In questo studio, abbiamo esaminato e quantificato le modificazioni del complesso caderina-catenina, attraverso un'indagine immunostochimica su E-caderina e β -catenina in associazione all'espressione del *marker* mesenchimale vimentina (immunostochimica in doppio) in 25 prelievi biotici renali patologici nel cane. I risultati hanno mostrato una riduzione statisticamente significativa dell'espressione di E-caderina e β -Catenina, direttamente correlata al danno tubulo-interstiziale (TID). In un danno da moderato a grave l'espressione di E-caderina risultava notevolmente diminuita, con analoga perdita di espressione di β -catenina ($p < 0,001$). Il *marker* mesenchimale, vimentina, risultava espresso *de novo* nelle cellule epiteliali tubulari, nelle aree di infiammazione e co-espresso con il *marker* β -catenina, nell'immunostochimica in doppio. La perdita dell'espressione del complesso caderina-catenina potrebbe essere considerata come un meccanismo primordiale della transizione epitelio-mesenchimale, con perdita dell'integrità e della polarità dell'epitelio tubulare renale. Il cane potrebbe quindi costituire un efficace modello per terapie innovative nell'ambito della nefrologia.

Parole chiave: cane, EMT, fibrosi, molecole di adesione

E-CADHERIN AND β -CATENIN DOWN-EXPRESSION IN TUBULAR EPITHELIAL CELLS IN CANINE RENAL DISEASES

Mechanism of renal fibrosis leading to end stage kidney remains still a challenge of interest in humans. The pathogenesis of chronic kidney disease is characterized by progressive loss of kidney function and fibrosis. The mechanism of epithelial-mesenchymal transition (EMT) has been predominantly studied in *in vitro* studies and proved to be involved in the rprocess of renal fibrosis; we previously demonstrated the EMT of tubular epithelial cells in dogs. In this study, we examined and quantified the modifications of cadherin-catenin complex by immunohistochemistry of E-cadherin and β -catenin and the mesenchymal marker vimentin in 25 dogs with three different spontaneous inflammatory renal diseases. Results showed a significant down-expression of levels of E-cadherin and β -catenin directly correlated with the tubular-interstitial damage (TID). In TID grade 2 and 3 E-cadherin expression was significantly reduced ($p < 0.001$). β -catenin expression was overall similar to E-cadherin. The mesenchymal associated protein, vimentin, was *de novo* identified in tubules within areas of inflammation. In this work, we identified the loss of cadherin/catenin expression as an early mechanism in tubulo-interstitial fibrosis, which allows dissociation of structural integrity of renal epithelia and loss of epithelial polarity. The dog might therefore represent a good model for new therapies in nephrology.

Key words: adhesion molecules, canine, EMT, fibrosis

IL RUOLO DELLA MIOSTATINA NELL'ATROFIA DEI MUSCOLI MASTICATORI DEL CANE

Paciello Orlando^a, Costagliola Alessandro^a, Wojcik Slawomir^b, Trapani Francesca^a, Papparella Serenella^a

^aDipartimento di Patologia e Sanità animale – Settore di Anatomia Patologica. Università degli Studi di Napoli Federico II, via Delpino, 1, 80137 Napoli, Italia. ^bDepartment of Anatomy and Neurobiology. Medical University of Gdansk. Gdansk, Poland

La Miostatina (Mstn) è una proteina appartenente alla grande famiglia dei fattori di crescita e di differenziazione beta (TGF- β). Essa è presente soprattutto nei muscoli scheletrici e le sue principali attività sono sia quella di regolare in negativo lo sviluppo delle fibrocellule muscolari dei giovani in accrescimento sia di mantenere nella norma la massa muscolare negli adulti. Alcuni studi hanno dimostrato che miostatina contribuisce alla atrofia muscolare in diverse patologie, ma con meccanismi non ancora chiariti. La miostatina fino ad oggi non è mai stata studiata nella miosite dei muscoli masticatori del cane (CMMM), processo infiammatorio immunomediato dei muscoli deputati alla masticazione, caratterizzato da atrofia e fibrosi tissutale.

In questo studio, abbiamo esaminato, con tecniche di immunistochemical e di immunofluorescenza, l'espressione della miostatina, nelle CMMM ed in biopsie muscolari di controllo; mentre con il western blot è stata valutata la quantità della proteina espressa e del suo precursore (Mstn/MstnPP).

Mstn era fortemente espressa nelle fibre muscolari atrofiche, comparata con le fibre di dimensioni normali e con i controlli dove era debolmente espressa.

L'immunoblot mostrava un significativo aumento sia della Mstn che del precursore.

I nostri risultati suggeriscono un possibile ruolo della Mstn nella patogenesi dell'atrofia nelle CMMM. Questi aspetti potrebbero avere un'implicazione pratica in trials terapeutici con inibitori della Mstn nei cani con CMMM. (Supportato dal PRIN 2006 - Responsabile scientifico Serenella Papparella)

Parole chiave: Miostatina, Atrofia Muscolare, Miosite dei Muscoli Masticatori.

THE ROLE OF MYOSTATIN IN CANINE MASTICATORY MUSCLE ATROPHY

Myostatin (Mstn), a protein belonging to the transforming growth factor- β (TGF- β) superfamily, is predominantly present in skeletal muscle. It is considered a negative regulator of muscle growth during development and muscle mass during adulthood. Several studies have shown an increase of Mstn in muscle of human patients affected by systemic diseases with cachexia, musculo-skeletal system disorder or other pathologies causing muscular atrophy. Mstn has not been previously studied in Canine Masticatory Muscles Myositis (CMMM). The atrophy of masticatory muscles and their replacement with fibrous tissue, as a consequence of a chronic immune-mediate inflammatory process, are characteristic features of this frequently occurring disease. Fibrosis and muscle atrophy lead to inability to jaw movement therefore the dog feeding often becomes impossible.

Mstn has now been examined on muscle biopsies from 10 CMMM and 3 normal controls by confocal laser scanning microscopy (CLSM) in parallel with conventional immunohistology, and immunoblots to determine Mstn role in masticatory muscle atrophy.

By immunofluorescence atrophic muscle fibres were strongly and diffusely immunostained with the antibody against-Mstn/MstnPP as compared to the control. Immunoblots of muscle biopsies obtained from control and CMMM revealed two specific bands of 28 and 55 kDa corresponded to the Mstn dimer and MstnPP, respectively. Both bands were much more prominent on samples from CMMM biopsies. Densitometric analysis revealed that amount of Mstn protein, in CMMM, was increased 2.4-fold ($p < 0.05$), while the MstnPP was increased 2.6-fold ($p < 0.05$) as compared to normal control.

These data support the hypothesis that increase of intramuscular pool of Mstn-immunoreactive protein may contribute to the multifactorial pathophysiology of muscle atrophy in CMMM. Our findings may have practical implications in considering therapeutic trials with Mstn inhibitors in dogs with CMMM. (Supported by grant: to SP from the PRIN 2006.)

Key words: Myostatin, Muscle Atrophy, Canine Masticatory Muscle Myositis.

EMBOLIA FIBROCARILAGINEA DEL MIDOLLO SPINALE IN UN LEONE (*PANTHERA LEO*)

Ricci Emanuele, Cavicchio Paolo*, Arispici Mario, Cantile Carlo

*Dipartimento di Patologia Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria – Pisa; *Giardino Zoologico di Pistoia*

Un leone maschio, di 6 anni e del peso di 282 Kg, nato in cattività presso lo zoo di Pistoia, ha manifestato una paraplegia improvvisa con plegia dell'arto anteriore sinistro. L'animale giaceva in decubito laterale sinistro e mostrava uno stato del sensorio apparentemente normale. La motilità dell'arto anteriore destro, della testa e del collo apparivano nella norma. Gli arti posteriori manifestavano un certo grado di riflesso flessorio, anche crociato, e apparivano piuttosto rigidi ed in estensione. La coda non veniva mossa e l'arto anteriore sinistro non mostrava un riflesso di retrazione apprezzabile. L'esame neurologico sommario che ha permesso l'evidenziazione di questi segni, ha consentito di ipotizzare una localizzazione della lesione a livello cervico-toracico lateralizzata a sinistra. Le ipotesi diagnostiche differenziali includevano un'eziologia traumatica o vascolare. Il soggetto è deceduto 3 giorni dopo l'insorgenza della paralisi ed è stato sottoposto ad esame necroscopico. Macroscopicamente, il midollo spinale mostrava una tumefazione lateralizzata a sinistra a livello di C6 con edema delle radicole dei nervi sensitivi. Le sezioni trasversali del midollo spinale compreso tra C6 e C7 mostravano aree emorragiche e malaciche a carico della sostanza grigia e della sostanza bianca, in particolare dei cordoni latero-ventrali di sinistra. Istologicamente le lesioni a carico del midollo spinale cervico-toracico erano costituite da estese aree di necrosi della sostanza grigia e della sostanza bianca, accompagnate da cospicui infiltrati infiammatori di macrofagi e granulociti neutrofili, necrosi fibrinoide della parete delle arteriole intraparenchimali ed emorragie multifocali. Si osservavano inoltre numerosi frammenti di materiale fibrocartilagineo nel lume di alcune arteriole intraparenchimali e meningee. Queste lesioni erano indicative di un fenomeno infartuale a carico del midollo spinale cervico-toracico dovuto a embolizzazione di materiale di origine discale (embolia fibrocartilaginea, FCE). La FCE è una patologia vascolare ben conosciuta nelle razze canine non condrodistrofiche, segnalata raramente anche nel gatto, nel cavallo, nei suini e nei tacchini, mentre singoli casi sono stati descritti in un agnello, un vitello e in una tigre. In letteratura non sono ad oggi presenti descrizioni di FCE nel leone.

Parole chiave: embolia fibrocartilaginea, infarto midollare, mielomalacia, leone.

FIBROCARILAGINOUS EMBOLIC MYELOPATHY IN A LION (*PANTHERA LEO*)

A 6-year-old, captive-born, male lion with a 3-day history of acute and nonprogressive spastic paraplegia of the hind limbs and flaccid paraplegia of the left forelimb, was submitted for necropsy. Before and after the onset of the dramatic plegia, neither significant clinical abnormalities nor alterations of blood parameters were observed. The only appreciable gross lesion was restricted to the C6-C7 tract of the spinal cord, where a focal and asymmetric enlargement of the cord raised the nerve roots. On the cut surface, a fairly demarcated dark-red hemorrhagic lesion involved the latero-ventral funiculi and the ventral horn of the gray matter, exclusively on the left half of the spine. Histology revealed extensive necrosis, hemorrhages and degeneration of the neuroparenchima as well as several fibrocartilaginous emboli occluding the lumen of the intraparenchymal arteries. Several emboli were also detected inside the meningeal vessels. This is the first report of a case of fibrocartilaginous embolic myelopathy occurring in a lion

Key words: fibrocartilaginous embolism, spinal cord infarction, myelomalacia, lion.

MIXOMA DELLE GUAINA DEI NERVI PERIFERICI. STUDIO CLINICOPATOLOGICO E IMMUNOISTOCHEMICO DI UN TUMORE MIXOIDE DELLA GUAINA DEI NERVI PERIFERICI IN UN ARTO ANTERIORE DI UN GATTO

Anfossi Antonio¹, Mura Antonicca², Meloni Floriana¹, Pintore Laura³, Bionda Stefano¹,
Leoni Antonio¹, Antuofermo Elisabetta¹

¹Sez. di Patologia Generale e Anatomia Patologica. Dipartimento di Patologia e Clinica Veterinaria. Facoltà di Medicina Veterinaria. ²Istituto di Anatomia e Istologia Patologica. Facoltà di Medicina e Chirurgia. Università degli Studi di Sassari. ³Dipartimento di Sanità Pubblica Patologia Comparata e Igiene Veterinaria. Università degli Studi di Padova.

I tumori delle guaine dei nervi periferici (PNST) sono un gruppo eterogeneo di neoplasie che originano dalle cellule di schwann e/o dai fibroblasti perineurali. I PNST, classificati in benigni e maligni, sono stati descritti in tutti gli animali domestici e nel gatto rappresentano circa il 3 % di tutte le neoplasie cutanee e sottocutanee. Solamente nel cane è descritta una rara variante di PNST di tipo mixoide con predilezione per le dita. Nei PNST dell'uomo viene descritta una distinta neoplasia a forte predilezione per le estremità distali degli arti, chiamata mixoma delle guaine dei nervi periferici. Riferiamo su un gatto europeo maschio di 8 anni, con una neoformazione nel metacarpo sinistro a crescita lenta. Dall'esame citologico si diagnosticava una neoplasia mesenchimale a cellule fusate. Macroscopicamente tale neoplasia presentava aspetto gelatinoso. I campioni fissati in formalina erano sottoposti a colorazioni istochimiche (E.E., Blu di Toluidina, PAS, Alcian Blu) ed immunoistochimiche (Pancitocheratine, Vimentina, S-100, GFAP, NSE, α -actina-L, Desmina, Calponina, Fattore VIII). Istologicamente la neoplasia si presentava multilobulata a localizzazione dermica. Immerse in abbondante matrice mixoide si osserva la presenza di cellule talvolta fusate e organizzate in corte palizzate, e talvolta epitelioidi e organizzate in cordoni. Tali cellule erano positive alla vimentina, S-100, NSE, GFAP, e collagene IV. Le stesse, erano negative alla panCK, α -actina-L, desmina, calponina, fattore VIII. Le peculiarità riscontrate e la forte similitudine esistente con l'uomo suggeriscono la possibilità di adottare anche in campo veterinario la terminologia di mixoma delle guaine dei nervi periferici per questo tipo di neoplasia.

Parole chiave: gatto; mixoma della guaina dei nervi periferici; collagene IV

PERIPHERAL NERVE SHEATH MYXOMA. CLINICOPATHOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY OF A MORPHOLOGICALLY DISTINCTIVE MYXOID PERIPHERAL NERVE SHEATH TUMOR IN THE FORELIMB OF A CAT

Peripheral nerve sheath tumors (PNST) are a class of nervous system tumors which arise in both schwann cells and perineural fibroblasts. Benign and malignant PNSTs are reported to occur in all domestic animals. In cats they represent 3% of all cutaneous and subcutaneous neoplasms. Only in dogs mixoid PNST has been observed generally localized in the fingers. In humans, PNSTs are rare neoplasms, and nerve sheath myxomas are a distinct neoplasia most commonly found in limb extremities. We examined the case of an 8-year-old European male cat with a neoplasm in the left metacarpus. Cytology revealed a spindle cell mesenchymal neoplasm. Samples were formalin-fixed, subjected to istochemical staining and to immunohistochemistry (pancytokeratin, vimentin, S-100 protein, GFAP, NSE, collagen IV, α -actina-L, desmin, calponin, factor VIII). Istologically, a dermic multilobulated neoplasia was observed. Bundles of spindle cells with palizating nuclei and small cluster of epithelioid cells were admixed in an abundant mixoid matrix. Immunohistochemically these cells were positive for vimentin, S100 protein, NSE, GFAP and collagen IV negative for panCK, α -actina-L, desmin, calponin, and factor VIII. Due to the peculiar characteristics of this lesion and the strong similarity with this type of neoplasm in humans, we believe it is possible to use the terminology nerve sheath myxoma in the veterinary field.

Key words: cat; nerve sheath tumors myxoma; collagen IV

PRIMA SEGNALAZIONE DI UN CASO DI TUMORE MISTO MULLERIANO DELL'OVAIO IN UN CANE

Antuofermo Elisabetta¹, Cocco Raffaella², Borzacchiello Giuseppe⁴, Burrai Giovanni P.¹, Meloni Floriana¹, Pirino Salvatore¹, Cossu-Rocca Paolo³, Bosincu Luisanna³

¹Sez. di Patologia Generale e Anatomia Patologica. ²Sez. di Patologia e Clinica Medica. Dipartimento di Patologia e Clinica Veterinaria. Facoltà di Medicina Veterinaria. ³Istituto di Anatomia e Istologia Patologica. Facoltà di Medicina e Chirurgia. Università degli Studi di Sassari. ⁴Dipartimento di Patologia e Sanità animale. Facoltà di Medicina Veterinaria. Università degli studi di Napoli

Tra i tumori primari dell'ovaio l'adenocarcinoma è la forma più frequentemente riscontrata nel cane adulto. Nella donna questa neoplasia è piuttosto comune, mentre forme miste come il carcinosarcoma, chiamato anche tumore misto mulleriano (MMMTs) sono rare. La variante eterologa del MMMT dell'ovaio presenta elementi maligni di natura sarcomatosa, come osso e cartilagine. In veterinaria sono stati descritti alcuni casi di MMMT a carico dell'utero. Scopo del presente studio è descrivere da un punto di vista morfologico ed immunoistochimico un caso di MMMT eterologo dell'ovaio in un cane. Un cane meticcio femmina di 10 anni, morto per shock cardiaco, fu sottoposto a necropsia. Macroscopicamente entrambe le ovaie erano costituite da materiale necrotico emorragico associato alla presenza di noduli duri. Si osservava inoltre la presenza di metastasi polmonari. I campioni fissati in formalina, inclusi in paraffina erano colorati in E.E. Gli stessi venivano poi avviati alla processazione immunoistochimica con i seguenti anticorpi: cytokeratin (AE1/3; CK 7), vimentina, S-100, α -actina-L, desmina, calponina, Ki-67, E-caderina, estrogeni (α - β) e Cerb-2. Istologicamente entrambe le ovaie erano composte da elementi maligni epiteliali e stromali fusi insieme in misura variabile. I primi erano costituiti da strutture papillari positive alle citocheratine, i secondi da cellule di forma poligonale immerse in matrice condroide ed osteoide positive alla vimentina e all' S-100. La componente neoplastica dell'ovaio era inoltre positiva agli estrogeni, alla E-caderina e al Cerb-B2. Il Ki67 era più alto nella componente carcinomatosa rispetto alla sarcomatosa. Dalle notevoli analogie tra il MMMT ovarico della donna e il nostro caso riteniamo di aver diagnosticato il primo caso di tumore misto mulleriano dell'ovaio in un cane.

Parole chiave: cane; immunoistochimica, tumore misto mulleriano; ovaio

FIRST REPORT OF CANINE MALIGNANT MIXED MULLERIAN TUMOR OF THE OVARY

Adenocarcinoma is the most represented histotype of primary ovarian neoplasms in aged bitch. In woman, adenocarcinomas are quite common, whereas mixed forms as carcinosarcomas, or malignant mixed mullerian tumors [MMMTs] are rarely reported. The aim of the present study is to describe light and immunohistochemical findings of canine heterologous ovarian MMMT. A complete necropsy was performed of an inbred bitch of 10-year-old. Macroscopically main findings showed both ovaries as necrotic and haemorrhagic masses associated with firm nodules. Pulmonary multiple lesions were also observed. Samples were fixed in formalin and paraffin embedded. Sections were stained with H.E. Tissues were immunohistochemically submitted to the following antibodies: CK AE1/3, CK 7, vimentin, S-100, α -actina-L, desmin, calponin, Ki-67, E-cadherin, estrogen receptor and Cerb-2. Histologically both ovaries were composed of variably admixed malignant epithelial elements arranged mainly in papillae and positive for cytokeratins and malignant stromal cells embedded in a chondroid and osteoid matrix that were positive for vimentin and S-100. Ovarian malignant epithelial cells were also positive for estrogen receptors, E-cadherin, Cerb-B2. Ki-67 was higher in carcinomatous component than sarcomatous. In conclusion, given the similarity with human ovarian MMMT, we described a case of heterologous ovarian MMMT reported for the first time in a dog.

Key words: dog, immunohistochemistry, malignant mixed mullerian tumor, ovary

PROFILI PROTEOMICI IN TUMORI UROTELIALI BOVINI

Urraro C.¹, Brun R.¹, Raso C.², Roperto S.¹, Russo V.¹, Roperto F.¹

¹Dip. Patologia e Sanità Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Napoli Federico II. ²Dip. Medicina Sperimentale e Clinica, Università Magna Grecia, Catanzaro

Il papillomavirus bovino tipo 2 (BPV-2) gioca un ruolo centrale nel determinismo dei tumori spontanei della vescica urinaria nei bovini grazie all'oncoproteina E5. Recentemente è stata dimostrata l'interazione dell'E5 con il recettore beta del fattore di crescita derivante dalle piastrine (PDGFβ).

La proteomica fornisce una valida tecnologia per l'analisi dei livelli di espressione simultanea di un gran numero di proteine.

In questo studio riportiamo alcuni profili proteomici di tumori della vescica di bovini allo scopo di documentare la presenza di proteine, finora sconosciute, che possono, in qualche modo, essere coinvolte nei pathway molecolari dei tumori uroteliali. Tra queste, abbiamo osservato la presenza di E2F3, di istoni ed in particolare di H4, H2B, calpaina p94, endopina 2B, aldeide deidrogenasi, glicogenofosforilasi e subunità D della pompa di H⁺ ATPasi.

In questo studio preliminare, viene discussa la presenza ed il significato di alcune di queste proteine, in particolare della calpaina p94 poichè è la prima segnalazione, in letteratura medica, della presenza di questa proteina nei tumori uroteliali.

La calpaina p94 finora è stata coinvolta nel determinismo di alcune patologie congenito-ereditarie, in particolare di alcune distrofie muscolari.

Parole chiave: BPV-2/ proteina E5/ PDGFβ/ Proteomica/ Calpaina p-94

PROTEOMIC PROFILES IN UROTHELIAL BOVINE TUMOURS

BPV-2 plays a central role in naturally occurring bladder carcinogenesis due to its oncoprotein E5. The interaction between E5 and platelet-derived growth factor receptor β (PDGFβ) has been recently clarified.

Proteomics provide valid technology for analyzing simultaneously levels of a large amount of proteins.

In this study, we report some proteomic profiles of bovine bladder cancers with the aim to document the presence of proteins, until now unknown, which can, in some way, be involved in molecular pathways of urothelial tumours. Among these, we observed the presence of E2F3, of histones, in particular H4 and H2B, of p94-calpain, endopin 2B, aldehydic dehydrogenase, glycogen phosphorylase and subunit D of vacuolar H⁺-ATPase (V-ATPase).

In this preliminary study, the presence and the meaning of these proteins are discussed, in particular of p94-calpain, as this one is the first report, in medical literature, about the presence of this protein in urothelial tumours.

Until now, p94-calpain has been involved in occurring of some congenital- hereditary pathologies, in particular muscular dystrophy.

DUE CASI DI TUMORE NASALE ENZOOTICO DELLA PECORA IN UMBRIA

Lepri Elvio¹, Filippini Giovanni², Mattiacci Silvia³, Pezzotti Giovanni², Vitellozzi Giovanni¹

¹Facoltà di Medicina Veterinaria, Perugia; ²Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia; ³Libero professionista, Perugia

Il tumore nasale enzootico (ENT) è un tumore contagioso dei piccoli ruminanti ad eziologia virale. Il retrovirus ritenuto responsabile è denominato ENTV ed esiste in due sottotipi differenti nella pecora (ENTV-1) e nella capra (ENTV-2). ENTV è strettamente correlato ai retrovirus endogeni dei piccoli ruminanti (ESRV) ed al retrovirus responsabile della Jaagsiekte (JSRV), con cui condivide sequenze genomiche e meccanismo patogenetico, quest'ultimo legato ad oncoproteine strutturali in grado di attivare vie di segnalamento intracellulari che portano dell'oncogenesi. Questi aspetti fanno di ENTV e JSRV interessanti modelli per studi di oncogenesi comparata.

L'ENT della pecora è diffuso su scala mondiale, ad eccezione di Australia e Nuova Zelanda, più comune in alcuni paesi europei come Francia, Germania e Spagna, e, a nostra conoscenza, non riportata in Italia. Scopo della comunicazione è descrivere due casi di tumore nasale enzootico in pecore di razza Lacune nate in un allevamento umbro da pecore importate dalla Francia.

Macroscopicamente i tumori erano costituiti da masse espansili polipoidi che occupavano la porzione etmoidale delle cavità nasali, formate da proliferazioni papillifere e tubulo-acinose di cellule cilindriche con moderata anisocitosi, compatibili con un adenocarcinoma a basso grado di malignità. I caratteri anatomo-istopatologici, tipici dell'ENT, consentivano una diagnosi di sospetto, confortata dall'evidenziazione ultrastrutturale di particelle retrovirus-like nelle porzioni apicali dei microvilli delle cellule neoplastiche.

Il tumore nasale enzootico, pur non considerato tra le malattie sottoposte ad obbligo di segnalazione, rappresenta un potenziale, e forse sottostimato, rischio per la popolazione ovicaprina autoctona esposta all'importazione di animali vivi da regioni ove l'infezione, e la malattia, è notevolmente diffusa.

Parole chiave: ovino, tumore nasale enzootico, retrovirus

TWO CASES OF ENZOOTIC NASAL TUMOR OF SHEEP IN UMBRIA

Enzootic Nasal Tumor (ENT) is a contagious viral tumor of small ruminants. The causative agent is a retrovirus (ENTV) existing in two subtypes in sheep (ENTV-1) and goat (ENTV-2). ENTV is strictly related to endogenous sheep retroviruses (ESRV) and jaagsiekte sheep retrovirus (JSRV), sharing with the latter genomic sequences and molecular pathways, due to structural oncoproteins responsible for intracellular signalling resulting in oncogenesis.

These features makes ENTV and JSRV interesting animal models for comparative oncogenesis.

Sheep ENT is worldwide distributed, with the exception of Australia and New Zeland, more common in certain european countries as France, Germany and Spain, and, in our knowledge, not reported in Italy.

The aim of the report is to describe two cases of ENT in Lacaune sheep born in Italy from animals imported from France.

Grossly the tumors were expansile polypoid masses invading ethmoidal region of nasal cavities, composed by papillary and tubulo-acinar structures of cylindrical cells with minimal anisocytosis, consistent with a low-grade adenocarcinoma. Anatomic-histopathological findings were typical of ENT and allowed a presumptive diagnosis, confirmed by the evidence of retrovirus-like particles in apical microvilli of neoplastic cells.

ENT, even if not included in the list of notifiable diseases, is a potential, maybe underestimated, risk factor for local sheep and goat herds, exposed to importation of live animals from areas known to be endemic for the infection.

Key words: sheep, enzootic nasal tumor, retrovirus

ESPRESSIONE DI C-KIT IN TESTICOLI NORMALI E NEOPLASTICI DI CANE – RISULTATI PRELIMINARI

Grieco V., Giudice C., Mosca F., Finazzi M.

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

In patologia umana, gli studi immunoistochimici sull'espressione di c-kit in testicoli normali e neoplastici sono numerosi. C-kit, recettore di membrana per la tiroxina chinasi, è espresso dalle cellule di Leydig e dalle cellule seminali primordiali e, in oncologia, risulta importante nella diagnosi differenziale tra seminoma classico e spermatocitico, in quanto è espresso nel primo ma non nel secondo. In veterinaria, analoghi dati relativi alla specie canina, sono scarsi o addirittura assenti. Lo scopo di questo lavoro è studiare l'espressione di c-kit nel testicolo normale ed in alcune neoplasie testicolari del cane.

Da 5 testicoli normali e da 11 neoplasie testicolari (8 seminomi, 1 sertolioma e 2 adenomi interstiziali) fissati in formalina e inclusi in paraffina sono state ottenute sezioni colorate immunoistochimicamente (ABC) per l'espressione di c-kit (anticorpo policlonale DAKO 1:600).

Nei testicoli normali c-kit era espresso nelle cellule di Leydig mentre cellule del sertoli e seminali risultavano negative. Positivi risultavano gli adenomi interstiziali e negativo il sertolioma. Dei seminomi, 5 risultati negativi sono stati classificati come spermatocitici e 3 risultati positivi sono stati classificati come classici. Il segnale positivo era localizzato nel citoplasma e poteva avere intensità variabile da cellula a cellula e non mancavano cellule negative.

L'espressione di c-kit nei testicoli di cane è del tutto sovrapponibile a quella osservata in medicina umana. C-kit marca le cellule interstiziali ma soprattutto riconosce quelle cellule seminali che mostrano ancora caratteri primordiali e che sono tipiche del seminoma classico. Questa marcatura rende possibile differenziare i seminomi classici da quelli spermatocitici. Va detto però che non tutte le cellule del seminoma classico sono ugualmente marcate, il segnale di positività può avere intensità variabile e non sono rare cellule negative. Per questa ragione si consiglia, in fase diagnostica, di processare ampie porzioni dei campioni inviati per evitare reperti di falsa negatività.

Parole chiave: cane, c-kit, testicolo, immunoistochimica

C-KIT EXPRESSION IN NORMAL AND NEOPLASTIC CANINE TESTIS – PRELIMINAR RESULTS

C-kit is a tyrosine kinase receptor expressed, in human testes by Leydig cells and primordial germ cells. C-kit is employed to differentiate classical from spermatocytic seminomas, the first being positive and the latter negative. In veterinary literature c-kit in canine testicular neoplasia is poorly investigated and data on normal testes are absent. To investigate the expression of c-kit in normal and neoplastic canine testes, formalin fixed and paraffin embedded sections of canine normal testes and 11 testicular tumors (8 seminomas, 1 sertolioma e 2 Leydig cell tumors) were stained immunohistochemically for c-kit (polyclonal DAKO 1:600 diluted). In normal testes, c-kit recognized interstitial cells and both Sertoli and seminal cells were negative. In neoplastic testes c-kit was expressed in interstitial cell tumor and not in sertoliomas. Among seminomas, 5 were negative and classified as spermatocytic, and 3 were positive and classified as classical. In these latter a variable intensity of the positive signal was observed, and negative cells were not rare. For this reason c-kit is useful in the differentiation between classical and spermatocytic seminomas but, to avoid false-negative diagnosis the exam of complete tumor section is recommended.

Key words: dog, c-kit, testis, immunohistochemistry

PROLATTINOMI IPOFISARI E SPETTRO DEI TUMORI MAMMARI IN TOPI FVB FEMMINE WILD TYPE DI 20-25 MESI DI ETÀ

Radaelli Enrico, Andrew Arnold, Papanikolaou Alexandros, Scanziani Eugenio, Cardiff D. Robert

Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Sezione di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, via Celoria, 10 - 20133, Milano, Italy (RE, SE). Center for Molecular Medicine, University of Connecticut School of Medicine, 263 Farmington Ave, Farmington, CT 06030-3101, USA (AA, PA). Center for Comparative Medicine, University of California, Davis, County Road 98 and Hutchison Drive, Davis CA 95616, USA (CDR)

Adenomi ipofisari prolattino (PRL)-secernenti sono comuni in topi FVB femmine di età avanzata. Nei topi, le neoplasie adenoipofisarie PRL-secernenti inducono lo sviluppo di tumori mammari con marcata differenziazione adenosquamosa.

I topi FVB rappresentano il ceppo d'elezione per lo sviluppo di modelli transgenici di carcinogenesi mammaria. Questo studio ha lo scopo di valutare l'incidenza e l'associazione tra tumori mammari e adenoipofisari spontanei in una popolazione di 65 topi FVB femmine wild type di circa 2 anni di età. La natura delle lesioni mammarie ed ipofisarie è indagata attraverso uno studio istopatologico ed immunohistochimico.

Dei 65 topi considerati, 20 (31%) presentavano tumore mammario e 19 (29%) tumore adenoipofisario. Tutti i tumori adenoipofisari esprimevano PRL e per questo sono stati classificati come prolattinomi. Tumore mammario e prolattinoma risultavano associati in 17 animali. Sulla base dell'esame morfo-immunofenotipico, i tumori mammari sono stati classificati come segue: 14 casi di adenocarcinoma (12 associati e 2 non associati a prolattinoma) con vari patterns di crescita epiteliale, 5 casi con prevalente fenotipo Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) associati a prolattinoma, 1 caso di peripheral nerve sheath tumor non associato a prolattinoma. Due casi di EMT tumor esprimevano Estrogen Receptor (ER) α .

Questo studio conferma l'alta incidenza di prolattinomi in topi FVB femmine e l'associazione tra questi e lo sviluppo di tumori mammari. Tuttavia, rispetto a quanto riportato in letteratura, un più vasto spettro di lesioni tumorali viene osservato a livello mammario. La positività a ER α nei tumori mammari con fenotipo EMT suggerisce inoltre come l'espressione prolattino-indotta di ER α sia un'importante meccanismo di carcinogenesi.

Parole chiave: EMT, Recettore per gli estrogeni, Topi transgenici

MAMMARY TUMOR SPECTRUM IN WILD TYPE AGEING FEMALE FVB MICE WITH PITUITARY PROLACTINOMAS

Prolactin (PRL)-secreting pituitary adenomas commonly occur as spontaneous lesions in ageing FVB female mice. In mice, PRL-secreting pituitary proliferative lesions, induce mammary tumorigenesis generally producing adenosquamous mammary carcinomas.

Since transgenic FVB mice are frequently used for mouse mammary tumor modelling, a cohort of 65, both nulliparous and multiparous, 20-25-month-old wild type FVB females is studied to establish the incidence of spontaneous mammary and pituitary tumors. Tissues from mammary and pituitary gland were examined by histopathology and IHC. Of the 65 mice studied, 20 (31%) had mammary tumors and 19 (29%) had pituitary tumors of the *pars distalis*. Seventeen of the 19 mice with pituitary tumors had concurrent mammary tumors. All pituitary tumors were PRL-positive by IHC and classified as prolactinomas. 14 mammary tumors (12 cases with and 2 without prolactinomas) were adenocarcinomas with various epithelial patterns. 5 mice with prolactinomas had Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) phenotype mammary tumors. A mouse with normal pituitary gland had a peripheral nerve sheath tumor in the mammary fat pad. Two EMT phenotype tumors were Estrogen Receptor (ER) α positive by IHC.

Consistent with previous reports, this study suggests that elderly FVB mice have a high incidence of prolactinomas with consequent PRL-induced mammary tumors. However, a broader morphological spectrum of spontaneous mammary tumor including cases with EMT phenotype, was observed in this cohort. ER α -positivity in EMT-tumors suggests that PRL-induced ER α upregulation could be a potential mechanism in breast tumorigenesis.

Key words: EMT, Estrogen receptor, Transgenic mice

VALUTAZIONE DELLE ALTERAZIONI ANATOMO-ISTO-PATOLOGICHE IN ORGANI BERSAGLIO DI BOVINI MACELLATI NELLA REGIONE SARDEGNA RICONDUCIBILI ALL'IMPIEGO ILLECITO DI PROMOTORI DI CRESCITA. RISULTATI PRELIMINARI

Anfossi Antonio*, **Appino Simonetta***, **Busia Gianluca****, **Francesca Tiziana Cannizzo*****,
Francesca Spada***, **Pisano Andrea***, **Leoni Antonio***

Dipartimento di Patologia e Clinica Veterinaria, Sezione di Patologia Generale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Sassari; **Dipartimento di Biologia Animale, Università degli Studi di Sassari; *Dipartimento di Patologia Animale, Università degli Studi di Torino*

Nella specie bovina, le sostanze farmacologiche anabolizzanti utilizzate in modo fraudolento, sono raggruppate in quattro grandi categorie: beta-agonisti, tireostatici, cortisonici, steroidi sessuali.

Queste sostanze, determinano alterazioni morfologiche in organi bersaglio che sono rilevabili all'esame anatomico-istopatologico. Questo tipo di indagine assume notevole importanza nello screening, favorendo l'azione di prevenzione con l'individuazione di allevamenti a rischio.

Attualmente sono stati esaminati 127 capi, 76 maschi e 51 femmine, di cui 32 vitelli e 95 vitelloni. Di tutti i campioni erano valutati parametri macroscopici e istologici, e per ogni animale si otteneva un giudizio finale relativo alla positività o meno all'uso di sostanze anabolizzanti, attribuendolo ad una delle tre categorie: negativo, dubbio e sospetto. Allo stato attuale è stato possibile identificare 27 soggetti dubbi e 11 sospetti di aver subito trattamenti anabolizzanti riconducibili all'uso di cortisonici, 19 soggetti dubbi e 18 sospetti di aver subito trattamenti anabolizzanti riconducibili all'uso di steroidi sessuali e 14 dubbi e 6 sospetti di aver subito trattamenti anabolizzanti riconducibili all'uso di associazioni di farmaci, in particolare cortisonici/steroidi sessuali. I risultati ottenuti finora, benché ancora insufficienti per una visione globale della situazione nel territorio regionale Sardo, permettono di evidenziare delle positività sull'uso di sostanze illecite in particolare per quanto riguarda i cortisonici, gli steroidi sessuali e le associazioni di questi e dimostrano l'efficacia dell'esame anatomico-istopatologico nell'attività di screening finalizzata all'identificazione degli allevamenti a rischio.

Parole chiave: Bovini, anabolizzanti, Cortisonici, Steroidi sessuali.

EVALUATION OF ANATOMICAL AND HISTOPATHOLOGICAL CHANGES IN TARGET ORGANS OF CATTLE SLAUGHTERED IN SARDINIA AS A RESULT OF THE ILLEGAL USE OF GROWTH HORMONES. PRELIMINARY RESULTS

Within the bovine specie, illegal use of anabolic agents can be grouped into four categories: beta-agonists, thyrostatics, glucocorticoids, sexual steroids.

These substances, further their anabolic effect, cause morphological changes in target organs which can be evidenced by anatomical and histopathological testing. Such investigations are extremely important to screen and to detect in advance groups of animals in risk-breeding. Actually, 127 cattle were examined, 76 males and 51 females of which 32 were calves and 95 were beeves. Samples from each animal were submitted to macroscopic and histological examination. From each subject a final evaluation was made based on the presence of anabolic substances. Three categories were adopted: negative, doubt and suspect. It we identified 27 doubt cases and 11 were suspected to received anabolic treatment using glucocorticoids, 19 doubt cases and 18 suspected to received treatment using sexual steroids and 14 doubt cases and 6 suspected to received a cocktail of drugs, in particular glucocorticoids and steroids hormones. Despite we got few results to elucidate the complete situation in Sardinia we have shown through the anatomico-histopathological examination of target organs, an illegal use of some substances such as glucocorticoids, sexual steroids and their association in cattle breeding.

Key words: Bovine, anabolic agents, glucocorticoids, sexual steroids.

REPERTI ANATOMO-ISTOPATOLOGICI DELLA CALCINOSI NELLE CAPRE: INDAGINI PERSONALI

Di Marco Vincenzo, Loria Guido Ruggero, Settineri Filippo*, Aronica Vincenzo, Mazzola Antonino, Russo Miriam, Capucchio Maria Teresa*****

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, Area di Barcellona P.G. (Messina), Via S. Andrea 96, 98051 Barcellona P.G. (Messina), Italia; *Azienda Sanitaria Locale n. 5 –Servizio Veterinario di Barcellona P.G. (Messina); **Medico Veterinario convenzionato Associazione Regionale Allevatori Sicilia; ***Dipartimento di Patologia Animale, Università degli Studi di Torino, Via Leonardo da Vinci 44, 10095 Grugliasco (Torino), Italia.*

La calcinosi è un riscontro non frequente associato all'ipervitaminosi D o alle intossicazioni degli erbivori causate dall'ingestione di vegetali che contengono composti analoghi ai metaboliti finali della vitamina D3 (colecalfiferolo) 1,25-(OH)2D3 coniugata con un glucoside quali *Solanum Malacoxylon*, *S. torvum*, *Cestrum diurnum*, *Trisetum flavescens*. Nei ruminanti in particolare queste intossicazioni provocano forme cachettizzanti associate a calcificazioni sistemiche particolarmente evidenti in tessuti fibroelastici quali il cuore e i grossi vasi arteriosi. Talora si osservano anche fenomeni di calcinosi in sede polmonare o in altri organi quali tratto gastro-enterico, reni e muscoli. Gli Autori descrivono le lesioni di calcinosi enzootica riscontrata in tre capre adulte, di razza autoctona, di età superiore ai 5 anni inviate al macello a seguito della operazione naturale di scarto che ogni anno l'allevatore mette in atto nel proprio allevamento. L'azienda ovicaprina di provenienza di questi animali è dislocata all'interno del territorio del Parco delle Madonie e gli animali pascolano nel periodo estivo in terreni a quota oltre i mille metri slm. A seguito dell'esame ispettivo il Veterinario Ufficiale del mattatoio ha sequestrato gli apparati respiratori di tre capre che, all'esame visivo ed alla palpazione, presentavano il parenchima polmonare con calcificazioni a diverso livello di gravità. Questi macroscopicamente si presentavano leggermente aumentati di volume in modo diffuso o focale, induriti, di aspetto stridente al taglio ed in sezione avevano l'aspetto poroso simile ad una fine spugna calcificata. Macroscopicamente l'endocardio, in sede valvolare, appariva ricoperto da placche o piccole scaglie biancastre opache. L'esame istologico ha rilevato depositi di diverse dimensioni. I polmoni meno colpiti presentavano fini calcificazioni a livello di membrane basali delle pareti alveolari che apparivano segnate da esili tratti basofili. Nelle forme più gravi si rilevavano calcificazioni di maggiori dimensioni associate a fenomeni di fibrosi interstiziale anche piuttosto intensa, moderata flogosi non purulenta e calcificazioni delle cartilagini delle pareti dei bronchioli e piccoli bronchi. Istologicamente depositi di calcio cristallino apparivano localizzati lungo il decorso parallelo delle fibre elastiche dello strato sottoendoteliale dell'endocardio ed in taluni casi si estendevano per uno spessore cospicuo nell'endocardio stesso. Le fibre calcificate apparivano ingrossate, intensamente colorate e dissociate tra loro. In taluni punti le zone calcificate erano addirittura in preda a metaplasia cartilaginea.

Parole chiave: calcificazioni, capre, polmone, endocardio

PATHOLOGICAL FEATURES OF CALCINOSIS IN GOATS: PERSONAL INVESTIGATIONS

The authors describe the lesions associated with calcinosis in three goats living into the Madonie protected area in Sicilia. The animals, more than 5 years old, showed macroscopical and histological lesions in lungs and heart. In lungs fine deposits along basal membranes of alveoli or most important calcifications in the interstitium were detected, sometimes associated with fibrosis and non suppurative inflammation. In the endocardium fine depositions of calcium were located along the connective fibres of the subendothelium. Cartilaginous metaplasia were also detected.

Key words: calcifications, goats, lung, heart

PRESENZA DI CROMO ESAVALENTE IN TROTE FARIO DEL FIUME LETE (CE): RILIEVI CHIMICI ED ANATOMO-ISTOPATOLOGICI

De Vico G.¹, Cataldi M.³, Coppola M.², Carella F.^{1,4}, Di Napoli A.², Ioannone L.⁵, Mongillo A.⁵, Melluso G.²

¹Dipartimento delle Scienze Biologiche, Università degli Studi di Napoli Federico II, Via Mezzocannone 8, 80134, Napoli. ²Dipartimento di Biologia Strutturale e Funzionale, Università degli Studi di Napoli Federico II, Via Cinthia, sede di Monte Sant'Angelo, Napoli. ³Dottorato di ricerca in Normativa dei Paesi dell'UE Protezione e Benessere degli Animali, Università degli Studi di Messina. ⁴Dottorato di ricerca in Scienze Biotecnologiche, Università degli studi di Napoli Federico II. ⁵Corpo di Polizia Provinciale – Caserta

In questo studio sono riportati i risultati preliminari di rilievi chimici ed anatomico-istopatologici in n° 8 trote fario (*Salmo trutta*), prelevate in località Pratella (CE), nel fiume Lete; di queste, quattro erano state ritrovate morte insieme a numerose altre in prossimità della Cartiera Lete; altre quattro erano state prelevate vive direttamente dal fiume (due a monte della Cartiera Lete e due a valle della stessa). I soggetti campionati erano sottoposti per metà (2 soggetti morti più uno per ciascun sito di cattura per quelli prelevati a monte e a valle della cartiera) ai routinari esami anatomico-istopatologici, e i rimanenti a ricerche tossicologiche, microbiologiche e chimiche di routine. Nei soggetti trovati morti, gli esami chimici evidenziavano presenza di discrete concentrazioni di cromo esavalente (2670 ppb), mentre l'esame anatomico-istopatologico mostrava degenerazione, congestione ed emorragie in vari organi e tessuti, associate a lesioni degenerative nervose. Nei soggetti prelevati dal fiume, gli esami mostravano, per i campioni catturati a monte della cartiera: scarse lesioni branchiali, lieve degenerazione epatica e renale, e livelli di cromo esavalente pari a 1540 ppb. rispettivamente. Per i campioni prelevati a valle della Cartiera era invece possibile osservare gravi lesioni branchiali (edema e distacco lamellare, fusioni lamellari e flogosi), congestione epatica associata a spandimenti emorragici parenchimali e congestione e degenerazione renale, con livelli di Cromo esavalente pari a 3450 ppb. I risultati ottenuti c'inducono ad approfondire le ricerche sugli end-point tissutali in presenza di accumulo di metalli pesanti, nella ricerca di markers istopatologici d'inquinamento ambientale.

Parole chiave: Cromo esavalente; istpatologia; biomarker

EXAVALENT CHROMIUM IN TROUTS FROM LETE RIVER (CASERTA). CHEMICAL AND PATHOLOGICAL FINDINGS

The aim of this study was to describe the chemical, gross anatomical and histopathological findings in No. 8 fario trout (*Salmo trutta*), from the Lete river (Pratella-CE). Among these four trout were found dead, and the other four were fished near a Paper-mill. In subjects found dead discrete quantity of hexavalent chromium (2670 ppb) was detected, while the gross anatomical and histopathological examination showed degeneration, congestion and bleeding in various organs and tissues, associated with degenerative nerve injuries. In subjects taken by the river upstream, gill, liver and kidney lesions were associated to high level of hexavalent chromium too (1540 ppb -3450 ppb).

Further study are necessary in order to better correlate microscopic and chemical results in order to provide new histological markers for environment pollution.

Key words: hexavalent chromium; histopathology; biomarker

LESIONI COMPATIBILI, MA LABILI TRACCE DI *MORBILLIVIRUS*: COSA HA PROVOCATO I RECENTI EPISODI DI MORTALITÀ NELLE STENELLE (*STENELLA COERULEOALBA*) DEL MAR LIGURE?

Di Guardo Giovanni¹, Proietto Umberto¹, Di Francesco Cristina Esmeralda¹, Marsilio Fulvio¹, Zaccaroni Annalisa², Scaravelli Dino², Mignone Walter³, Caroggio Piero³, Garibaldi Fulvio⁴, Ballardini Marco⁴, Kennedy Seamus⁵, Forster Fiona⁵, Bozzetta Elena³, Iulini Barbara³, Casalone Cristina³

¹Dipartimento di Scienze Biomediche Compare, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Teramo, Teramo, Italia; ²Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e di Patologia Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bologna, Ozzano Emilia (Bologna), Italia; ³Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Italia; ⁴Dip.Te.Ris., Università degli Studi di Genova, Genova, Italia; ⁵Agri-Food and Biosciences Institute for Northern Ireland, Stormont, Belfast, Irlanda del Nord (Regno Unito)

Nel presente lavoro vengono presentati e discussi i risultati delle indagini necroscopiche, parassitologiche, microbiologiche, istopatologiche, immunoistochimiche, di immunofluorescenza indiretta (IFI), biomolecolari (RT-PCR) e sierologiche condotte su 8 esemplari (1 maschio neonato, 1 femmina subadulta, 5 femmine ed 1 maschio adulti) di stenella striata (*Stenella coeruleoalba*) rinvenuti spiaggiati nel periodo Agosto-Novembre 2007 in provincia di Imperia.

Una polmonite (bronco-interstiziale) era evidente in 6 stenelle, con presenza di numerosi corpi parassitari in sede sia polmonare, sia extra-polmonare. Una meningo-encefalite subacuto-cronica multifocale non purulenta si osservava altresì in 4 animali (1 maschio e 3 femmine adulte), in cui erano istologicamente apprezzabili più o meno spessi manicotti perivasali di cellule infiammatorie mononucleate, con contestuali aggregati macrofagici in sede peri-paravasale. Lievi infiltrati linfoplasmacellulari erano presenti a livello dei plessi corioidei, mentre moderate espressioni di sofferenza interessavano isolati o alcuni gruppi di neuroni, senza che fosse possibile dimostrare la presenza di inclusioni virali né al loro interno, né all'interno di altri tipi cellulari.

I sieri di 4 stenelle (1 neonato, 1 subadulto, 2 adulti) contenevano inoltre anticorpi neutralizzanti anti-*Morbillivirus*, ad un titolo compreso fra 1:10 e 1:40. Ciononostante, le indagini immunoistochimiche, in IFI ed in RT-PCR per *Morbillivirus* hanno avuto esito negativo in tutti gli animali.

In conclusione, si ritiene che ad una o più *noxae* diverse dal *Morbillivirus* sia verosimilmente da ascrivere l'eziologia primaria degli episodi di mortalità in questione. Ulteriori indagini sono comunque necessarie per confermare tale ipotesi.

Nota: Lavoro svolto nell'ambito del Progetto di Ricerca "Cause di Mortalità e Studi Patogenetici in Cetacei Spiaggiati sulle Coste Italiane", finanziato dal Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare.

Parole chiave: Stenella striata, Mar Ligure, *Morbillivirus*.

LESIONS WERE THERE, *MORBILLIVIRUS* WAS NOT (ALMOST): WHAT KILLED STRIPED DOLPHINS (*STENELLA COERULEOALBA*) IN 2007 ALONG THE LIGURIAN SEA COAST OF ITALY?

We report herein the results of necropsy, parasitological, microbiological, histopathological, immunohistochemical (IHC), indirect immunofluorescence (IIF), biomolecular (RT-PCR) and serological investigations carried out on 8 (1 male calf, 1 subadult female, 5 adult females, 1 adult male) striped dolphins (*S. coeruleoalba*) found stranded from August to November 2007 on the Ligurian Sea coast of Italy.

A (broncho-interstitial) pneumonia occurred in 6 animals, with numerous parasitic bodies in both pulmonary and extra-pulmonary locations. Histologically, a multifocal, subacute to chronic, non-purulent meningo-encephalitis occurred in 1 adult male and 3 adult females, with more or less prominent perivascular cuffs of inflammatory mononuclear cells and peri-paravascular macrophage accumulations. A mild choroid plexus lymphocytic-plasmacytic infiltration was also present, along with moderate neuronal damage, although no viral inclusions were seen in any brain cell (nor in any other cell type). The blood sera from 4 dolphins (1 calf, 1 subadult, 2 adults) had anti-*Morbillivirus* neutralizing antibodies, with positive titres ranging from 1:10 to 1:40. Nevertheless, IHC, IIF and RT-PCR investigations gave negative results in all animals.

In conclusion, one or more factors other than *Morbillivirus* likely were the primary cause of these dolphin mortality episodes.

Key words: Striped dolphin, Ligurian Sea, *Morbillivirus*.

ASPETTI CLINICI E ANATOMO-ISTOPATOLOGICI DI UNA FORMA ESANTEMATICA DI FEBBRE CATARRALE MALIGNA (MCF)

Di Marco Vincenzo, Russo Miriam, Aronica Vincenzo, Bartolone Concetta*, Biondo Giovanni*, Tumeo Giuseppe, Fiasconaro Michele, Capucchio Maria Teresa*****

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, Area di Barcellona P.G. (Messina), Via S. Andrea 96, 98051 Barcellona P.G. (Messina), Italia; *Azienda Sanitaria Locale n. 5 – Servizio Veterinario di Barcellona P.G. (Messina); **Medico Veterinario convenzionato Associazione Regionale Allevatori Sicilia; ***Dipartimento di Patologia Animale, Università degli Studi di Torino, Via Leonardo da Vinci 44, 10095 Grugliasco (Torino), Italia*

La febbre catarrale maligna (MCF) è una malattia mortale dei bovini provocata da un Herpesvirus, ovine herpes virus-2 o alcelaphine herpes virus-1, solitamente a carattere sporadico. Clinicamente è caratterizzata da rialzo termico, scolo nasale ed oculare, iperventilazione e morte. Alla necropsia lesioni muco-purulente possono coinvolgere molti organi, ma in particolar modo gli apparati gastro-enterico, respiratorio e urinario in associazione a linfadenopatia. Istologicamente si osserva una vasculite generalizzata. Verso la fine del 2007 sono state segnalate quattro bovine di razza Bruna Italiana, di età compresa tra 6 e 8 anni, con sintomi clinici ascrivibili ad una patologia sistemica. Gli animali erano allevati in un'azienda della provincia di Messina insieme a n°20 ovini introdotti in azienda sei mesi prima. Clinicamente i bovini mostravano grave scolo nasale ed oculare muco-purulento tipico della "head and eye form" della MCF, rialzo termico, diarrea e dermatite necrotizzante (forma esantematica). Due bovine presentavano anche difficoltà di andatura, tremori muscolari e convulsioni. L'esame necroscopico ha rivelato estese flogosi e lesioni crostose a carico della cute, ulcere faringee, miocardite e splenite fibrinosa. Istologicamente le lesioni più gravi, riscontrate a livello di cute, cuore ed encefalo erano rappresentate da grave flogosi linfocitaria talora a sfondo necrotizzante associata a vasculite. Purtroppo sinora nessun agente biologico è stato isolato e indagini di biologia molecolare sono ancora in corso. Anticorpi verso HV sono però stati identificati, mediante immunofluorescenza indiretta, in tutti gli animali. Inoltre il fatto che nella stessa azienda venissero allevati degli ovini rafforza l'ipotesi di una malattia infettiva da essi veicolata. Il quadro clinico e i reperti anatomicopatologici rilevati, confortati dai dati sierologici e anamnestici, permettono agli autori di considerare i casi sopra descritti come forma esantematica di MCF.

Parole chiave: Bovini, febbre catarrale maligna, vasculite diffusa

CLINICAL AND PATHOLOGICAL FEATURES OF MALIGNANT CATARRHAL FEVER IN CATTLE

Malignant catarrhal fever (MCF) is a fatal disease of cattle, whose causative agent is an Herpes virus. The most prominent clinical manifestations of MCF are body temperature, nasal and ocular secretions, hyperventilation and death. At necropsy necrotic and mucopurulent lesions are observed especially in the gastrointestinal, respiratory, and urinary tracts, associated to a lymphadenopathy. Histologically vasculitis are detected in almost all organs. Four Bruna Italiana cows, aged between six to eight years old, originating from a farm near to Messina, were detected during 2007 year. In the same farm, 20 mixed breed sheep were maintained. The clinical syndrome was consistent with the "Head and eye" form of MCF associated to the presence of cutaneous and neurological symptoms. Necropsy revealed severe exudation on the skin, faringeal ulcers, myocarditis and fibrinous splenitis. At histopathology, the main affected organs were the skin, heart and brain. Lymphocytic to necrotizing/ulcerative lesions were detected associated with vasculitis. No significant organisms were isolated. Antibodies to HV were detected in all animals. The fact that sheep were housed in the same farm reinforced the diagnosis of a disease transmitted by sheep. Based on those findings the authors can conclude that MCF occurred on the farm.

Key words: Cattle, malignant catarrhal fever, diffuse vasculitis

DIFFUSA METAPLASIA OSSEA DELLE SIEROSE IN UN VITELLO

**Di Marco Vincenzo, Russo Miriam, Aronica Vincenzo, Tomaselli Amedeo, Amedeo Stefano*,
Sereno Alessandra*, Fiasconaro Michele, Capucchio Maria Teresa***

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, Area di Barcellona P.G. (Messina), Via S. Andrea 96, 98051 Barcellona P.G. (Messina), Itali. *Dipartimento di Patologia Animale, Università degli Studi di Torino, Via Leonardo da Vinci 44, 10095 Grugliasco (Torino), Italy*

Raramente nello strato connettivo delle sierose si osservano fenomeni di metaplasia ossea rappresentati da frammenti minuscoli o placchette, di solito appiattite, di forma e dimensioni variabili. Tali reperti si riscontrano più comunemente in sede addominale e paiono esiti di flogosi croniche talvolta conseguenti ad interventi chirurgici o lesioni traumatiche. In sede toracica le ossificazioni delle sierose paiono ascrivibili a pregresse infezioni batteriche o fungine. Gli autori riportano un caso di metaplasia ossea sistemica delle sierose in un toro di tre anni incrocio Bruna Alpina - Blanc-Bleu Belga. Alla macellazione l'animale ha rivelato la presenza di disseminati focolai di ossificazione a carico delle sierose toraciche e addominali. Risultavano coinvolti soprattutto pleure, pericardio, periepate, perisplenio e sacco scrotale che mostravano ispessimenti miliari o placchette di dimensioni variabili. A livello splenico in particolare si osservavano diffuse lamine appiattite a carico della sierosa associate a disseminati depositi granulosi. L'esame istologico ha mostrato un diffuso ispessimento di tutte le sierose e la presenza di multifocali placchette ossee subito al di sotto del submesotelio. Lesioni metaplasiche delle sierose in campo veterinario sono state riportate più comunemente nel suino a livello di peritoneo e sono state segnalate nel cervo (Jubb and Kennedy, 1985; Mitchell et al., 1982). Si tratta probabilmente di lesioni metaplasiche del submesotelio. Il meccanismo istogenetico di tali modificazioni pare però controverso. In medicina umana, ove sono riportati maggiormente questi fenomeni di ossificazione peritoneali, paiono esito di pregressi interventi chirurgici o comunque insulti alle sierose in grado di riattivare cellule submesoteliali totipotenti che si differenziano secondo la linea mesenchimale o mesoteliale. Paiono inoltre poter essere coinvolti squilibri ormonali o ematologici (ferro, vitamine). Nel caso in oggetto purtroppo non sono stati eseguiti esami sierologici e pertanto non è possibile escludere che l'animale presentasse delle alterazioni del rapporto Ca/P/vitamina D, né degli ormoni coinvolti nella regolazione della calcemia.

Parole chiave Ossificazioni, sierose, toro, metaplasia

IDIOPATHIC OSSEOUS METAPLASIA OF THE SEROSAE IN A CALF

Rarely heterotopic ossifications of serosae are reported, generally in abdomen associated with chronic inflammations or as complications of abdominal surgeries. The authors report one case of systemic ossifications of the serosae observed in a bull, three years old. Macroscopically white to grey several small nodules or linear fragments were detected along the serosal surfaces of the abdominal and thoracic organs (spleen, liver, lung, heart and testis). Histologically a diffuse increase of the connective tissue of the serosae was detected associated with the presence of numerous osseous plaques. Osseous metaplasia in the peritoneum is not uncommon in pigs as a sequel to inflammation and was reported in a deer. The histogenetic explanation is controversy. This differentiation has been explained by the theory that there exists a population of submesothelial multipotent cells with ability to differentiate along mesenchymal and mesothelial lines. Hormone or haematological imbalances could be also involved. In the present case calcium, phosphorus and vitamin D were not investigated to evaluate their possible involvement.

Key words: Ossifications, serosae, bull, metaplasia

TUBERCOLOSI OVINA: REPERTI ANATOMO-ISTOPATOLOGICI DI UN RARO CASO DI TUBERCOLOSI GENERALIZZATA

Di Marco Vincenzo¹, Marianelli Cinzia², Russo Miriam¹, Tomaselli Amedeo³, Fiasconaro Michele, Capucchio Maria Teresa⁴, Caracappa Santo¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, Area di Barcellona P.G. (Messina), Via S. Andrea 96, 98051 Barcellona P.G. (Messina), Italy; ²Istituto Superiore di Sanità, Roma; ³Azienda Sanitaria Locale n° 5 – Messina; ⁴Dipartimento di Patologia Animale, Università degli Studi di Torino, Via Leonardo da Vinci 44, 10095 Grugliasco (Torino), Italy

Gli Autori riportano un caso molto raro di tubercolosi generalizzata sostenuta da *Micobacterium spp.* riscontrato al macello in una pecora di 4 anni di età, di razza Comisana. La pecora è stata sottoposta ad esame autoptico per evidenti lesioni granulomatose, che venivano in parte fissate in formalina al 10% e processate per l'esame istologico, in parte congelate a -80°C per le indagini colturali e di biologia molecolare. Le sezioni istologiche venivano colorate con ematossilina ed eosina e con il metodo Ziehl-Neelsen ed esaminate rispettivamente per la ricerca dei caratteristici granulomi e dei batteri acido resistenti. Dagli organi sede di lesioni (polmone, fegato, encefalo, diaframma, linfonodi polmonari, epatici, mediastinici, mesenterici) veniva eseguito l'esame colturale su terreno solido Lowenstein-Jensen. Gli stessi campioni erano sottoposti ad analisi molecolare utilizzando, a seguito dell'estrazione di DNA, una multiplex PCR amplificando sia con IS 6110 di *M. bovis* e *M. tuberculosis* (product size of 194 bp) sia con IS 1245 di *M. avium* (product size of 246 bp). All'esame anatomo-patologico l'animale presentava lesioni granulomatose diffuse ascrivibili ad una forma di generalizzazione precoce protratta di tubercolosi. Le stesse lesioni si osservavano istologicamente a carico di linfonodi, diaframma, polmone e fegato. A livello epatico le lesioni erano granulomi in stadio iniziale molto piccoli con centro necrotico non costantemente presente, cellule mononucleate intorno e rare cellule giganti di Langhans. A livello polmonare, linfonodale e diaframmatico si osservavano granulomi tipici con voluminose aree necrotiche calcificate, cellule di derivazione macrofagica, cellule di Langhans, linfociti e più o meno evidente capsula periferica. L'esame colturale e la colorazione Ziehl-Neelsen ha dato esito negativo su tutti i campioni esaminati. La multiplex PCR ha confermato la presenza di DNA di *Micobacterium spp.* solo nei campioni di diaframma, linfonodo polmonare e linfonodo mesenterico. La presenza di lesioni nel tratto respiratorio, come nel caso in studio, è la chiara evidenza che la specie ovina può essere fonte di infezione per gli altri animali ed essere un ulteriore fattore di rischio per le strategie di lotta contro la malattia. Sicuramente, in particolari tipologie di allevamento, la pecora dovrebbe essere considerata un potenziale serbatoio o fonte di infezione di *Micobacterium spp.* (Malone F.E. et al., 2003).

Parole chiave: Tubercolosi, ovino, istologia, PCR

OVINE TUBERCULOSIS: ANATOMO-HISTOPATHOLOGICAL FEATURES IN A RARE GENERALIZED FORM

The authors report one case of generalized tuberculosis in a sheep, 4 years old, submitted to necropsy for diffuse granulomatous lesions. Histologically lymph nodes, liver, diaphragm and lung showed typical granulomas characterized by a necrotic calcified core surrounded by macrophages, epithelioid cells and Langhans type cells. Peripheral fibroplasia were frequently detected. Acid fast resistant bacilli were not detected. Multiplex PCR confirmed the presence of DNA of *Micobacterium spp.* from samples of lymph nodes and diaphragm. This report confirm the important role of sheep as reservoir of tuberculosis.

Key words: Tuberculosis, sheep, histology, PCR

GRANULOMATOSI DEL TESSUTO LINFOIDE IN CORSO DI PMWS: CONFRONTO TRA FASE EPIDEMICA ED ENDEMICA DELLA MALATTIA

Fusaro Laura, Sarli Giuseppe, Morandi Federico, Bacci Barbara, Ostanello Fabio, *Leotti Giorgio, Mandrioli Luciana, Marcato Paolo Stefano

*Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale – Facoltà di Medicina Veterinaria – Università degli Studi di Bologna. *Merial Italia. giuseppe.sarli@unibo.it*

La PMWS, malattia sostenuta dal porcine circovirus di tipo 2 (PCV2), è stata segnalata per la prima volta in Italia nel 1998 e, analogamente a quanto verificatosi in altri Paesi, dopo un iniziale andamento epidemico, attualmente ha assunto un andamento endemico negli allevamenti intensivi di suini. Nei tessuti linfoidei, che costituiscono insieme al polmone i tessuti bersaglio del virus, accanto ad una deplezione cellulare è annoverata anche una flogosi granulomatosa. E' stato operato un confronto tra le lesioni ai tessuti linfoidei di 52 suini (per un totale di 187 stazioni linfoidei) con diagnosi conclusiva di PMWS campionati nel biennio 1998-2000 (periodo in cui la malattia presentava un andamento epidemico), con lesioni ai tessuti linfoidei di 127 suini (per un totale di 491 stazioni linfoidei) con diagnosi conclusiva di PMWS, campionati dal 2006 ad oggi (contesto endemico) nell'ambito di un piano di lavoro finanziato da MERIAL Italia per la diagnosi di PMWS. Tutti i casi erano disponibili come sezioni istologiche di materiale fissato in formalina, incluso in paraffina e colorato con ematossilina-eosina. Le stazioni linfoidee comprendevano linfonodi, milza e tonsille per il biennio 1998-2000, mentre per il campionamento più recente si disponeva di linfonodi, tonsille e tessuto linfoide dell'ileo. In tutti i casi esaminati era sempre registrabile una deplezione dei tessuti linfoidei di grado variabile che poteva essere abbinata alla presenza o di microgranulomi, costituiti da poche cellule epiteliodi centrofollicolari, o da granulomi in aggregati nodulari multipli, non delimitati e con scarsa tendenza alla confluenza, costituiti da macrofagi epiteliodi e scarse cellule giganti multinucleate. La flogosi granulomatosa era presente in 2 su 187 stazioni linfoidee nel biennio 1998-2000 (1,07%) ed in 61 stazioni linfoidee sul totale (491) nel periodo 2006 ad oggi (12,42%). Nella patogenesi della PMWS è dimostrata una ipersensibilità di IV tipo che permetterebbe lo sviluppo delle lesioni granulomatose, non registrabili in tutti i soggetti, verosimilmente in funzione dello stato di ipersensibilità individuale raggiunto. Lo stato di sensibilizzazione, cui consegue un eventuale innesco dell'ipersensibilità ritardata, è legata ad una elevata circolazione del virus, come avviene nell'attuale contesto endemico. La maggiore frequenza di lesioni granulomatose osservabile nel contesto endemico rispetto a quello epidemico riflette un maggiore livello di sensibilizzazione nella popolazione. Pertanto, pur rimanendo invariata la tipologia di lesioni (deplezione linfoidee e granulomatosi), la loro frequenza relativa può essere influenzata dalla condizione epidemiologica (epidemia, endemia) in atto.

Parole chiave: suino, PCV2, PMWS, tessuto linfoide, granuloma.

INTRODUZIONE

La sindrome multisistemica del deperimento post-svezzamento (PMWS = Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome) è una patologia virale ad evoluzione cronica, caratterizzata da un progressivo decadimento delle condizioni generali di salute dei suini in fase di post-svezzamento che, in alcuni casi, può portare ad elevati tassi di letalità. Le manifestazioni cliniche iniziano all'età di circa 40 giorni e la sintomatologia più significativa, seppur variabile e poco specifica, è rappresentata principalmente da deperimento, dispnea ed ittero (Harding e Clark, 1997).

Molteplici sono state le segnalazioni provenienti dagli Stati Uniti, dai paesi asiatici e dalla maggior parte dei paesi europei; è stata segnalata per la prima volta in Italia nel 1998 (Marcato et al., 1999).

Nella PMWS, sia macroscopicamente che dal punto di vista istologico, le lesioni predominanti si apprezzano regolarmente nei tessuti linfoidi (deplezione) e nei polmoni, ma sono registrate in certi casi anche lesioni renali ed epatiche, solitamente di tipo infiammatorio interstiziale (Ellis et al., 1998).

Le lesioni istologiche sono caratterizzate in maniera predominante da vari gradi di deplezione linfoide (da atrofia/ipotrofia fino a scomparsa delle strutture follicolari linfatiche, rarefazione e sostituzione del tessuto linfoide interfollicolare con cellule di aspetto monocitoide-macrofagico o di aspetto macrofagico-epitelioide) e da un'infiammazione granulomatosa sistemica che presenta cellule giganti sinciziali, evidenti corpi inclusi virali intracitoplasmatici anfophilici nelle cellule infette e una degenerazione parenchimale con necrosi da moderata a grave (Marcato et al., 1999; Krakowka et al., 2002).

Nella patogenesi della PMWS sono noti e dimostrati diversi meccanismi immunologici tra loro indipendenti. Il primo è rappresentato dalla immunodepressione che si deve considerare per lo più la conseguenza delle lesioni ai tessuti linfoidi (Krakowka et al., 2002). Una seconda evenienza è rappresentata dallo sviluppo di una ipersensibilità ritardata che permetterebbe lo sviluppo della flogosi granulomatosa (Krakowka et al., 2002).

In questo lavoro si è voluta valutare l'eventuale relazione tra la attuale diffusa esposizione al virus nella popolazione suina italiana (contesto endemico) con quella di circa un decennio fa che corrispondeva alla prima comparsa del virus negli

allevamenti italiani (contesto epidemico) ciò al fine di verificare la eventuale esistenza di una relazione fra il contesto epidemiologico e l'espressione della flogosi granulomatosa nei tessuti linfoidi in corso di PMWS.

MATERIALI E METODI

Nell'ambito di un piano di lavoro finanziato da Merial Italia per la diagnosi di PMWS, si è operato un confronto per individuare la numerosità delle lesioni granulomatose riscontrate nei tessuti linfoidi prendendo in considerazione i campioni esaminati in due periodi di tempo distinti, in cui la malattia ha assunto prima un andamento epidemico, poi endemico. Sono stati presi in considerazione per il confronto i tessuti linfoidi dei suini con diagnosi conclusiva di PMWS campionati durante il biennio 1998-2000 e dal 2006 ad oggi. Nel primo periodo i soggetti erano 52, per un totale di 187 stazioni linfoidi (Figura 1a). Era questo da considerarsi il periodo di esordio della malattia, primo momento in cui il virus colpiva gli allevamenti italiani, coerente con una situazione epidemiologica di tipo epidemico. Nel secondo periodo, invece, i suini erano 127, per un totale di 491 stazioni linfoidi (Figura 1b). In quest'ultimo periodo la condizione in Italia di elevata sieroprevalenza (Sala et al., 2000) pone come situazione epidemiologica quella di una epidemia.

Tutti i casi erano disponibili come sezioni istologiche di materiale fissato in formalina, incluso in paraffina e colorato con ematossilina-eosina e metodica immunistochemica per PCV2 (Sarli et al., 2008). Le stazioni linfoidi considerate comprendevano linfonodi, milza e tonsille per il biennio 1998-2000, mentre per il campionamento più recente si disponeva di linfonodi, tonsille e tessuto linfatico dell'ileo.

RISULTATI

In tutti i casi esaminati è risultata costante una deplezione dei tessuti linfoidi di grado variabile che poteva essere abbinata alla presenza o di microgranulomi, costituiti da poche cellule epitelioidi centrollicolari, o da granulomi in aggregati nodulari multipli, non delimitati e con scarsa tendenza alla confluenza, costituiti da macrofagi epitelioidi e scarse cellule giganti multinucleate (Figura 2).

La flogosi granulomatosa era presente in 2 su 187 stazioni linfoidi nel biennio 1998-2000 (1,07%)

ed in 61 stazioni linfoidi sul totale (491) nel periodo 2006 ad oggi (12,42%) (Figura 1b).

DISCUSSIONE

Le infiammazioni granulomatoze o granulomi, sono infiammazioni croniche produttive che presentano tipicamente un'organizzazione nodulare degli elementi infiammatori tra i quali predominano cellule derivate da trasformazione di macrofagi. A provocarle sono vari agenti flogogeni che la reazione infiammatoria acuta è incapace di distruggere (Marcato, 1997). Altre volte, invece, ha un ruolo di primo piano lo sviluppo di una ipersensibilità ritardata (Marcato, 1997).

La PMWS in Italia, analogamente a quanto verificatosi in altri Paesi, dopo un iniziale andamento epidemico, attualmente ha assunto un andamento endemico negli allevamenti intensivi di suini e quest'ultimo corrisponde ad una elevata circolazione del virus nelle popolazioni attuali di suino, che può comportare il possibile sviluppo di una ipersensibilità ritardata verso PCV2.

Il risultato ottenuto nel presente lavoro, cioè una frequenza di lesioni granulomatoze più elevata (12,42%) nel periodo endemico rispetto a quella più bassa (1,07%) del periodo epidemico (Figura 1b), rappresenta una osservazione “di campo” che il contesto epidemiologico influenza la frequenza relativa delle lesioni ai tessuti linfoidi e conferma quanto già dimostrato sperimentalmente.

Krakovka e coll. (2002) hanno dimostrato che le lesioni infiammatorie granulomatoze in caso di PMWS sono mediate da meccanismi presumibilmente cellulomediati in risposta a proteine ed epitopi virali antigenici. In particolare inducendo l'immunosoppressione con inoculazione esogena di cyclosporina si è notato che le lesioni granulomatoze sono assenti, nonostante il tessuto contenga alti titoli di infezione virale, segno che le lesioni granulomatoze caratteristiche di PMWS sono immunomediatae (Krakovka et al., 2002). Si è visto che l'attività replicativa virale avviene nei monociti e nei macrofagi, la maggior parte della proteina virale e del DNA si accumula negli stessi in seguito alla fagocitosi, risultando pertanto inattaccabile dall'azione degli elementi della flogosi acuta. Tale condizione è accompagnata dall'instaurarsi di una progressiva infiammazione cronica granulomatosa che compromette non solo i tessuti linfoidi, ma anche organi non linfoidi quali fegato e rene (Krakovka et al., 2002).

Nella patogenesi della PMWS è dimostrata quindi un'ipersensibilità di IV tipo che permetterebbe lo sviluppo delle lesioni granulomatoze, non registrabili in tutti i soggetti, verosimilmente in funzione dello stato di ipersensibilità individuale raggiunto. Lo stato di sensibilizzazione, cui consegue un eventuale innesco dell'ipersensibilità ritardata, è legato ad un'elevata circolazione del virus, come avviene nell'attuale contesto endemico. La maggiore frequenza di lesioni granulomatoze osservabile nel contesto endemico rispetto a quello epidemico riflette un maggiore livello di sensibilizzazione nella popolazione.

CONCLUSIONI

Sulla base dei risultati ottenuti, si evince che, pur rimanendo invariata la tipologia di lesioni (deplezione linfoide e granulomatosi), la loro frequenza relativa può essere influenzata dalla condizione epidemiologica (epidemia, endemia) in atto.

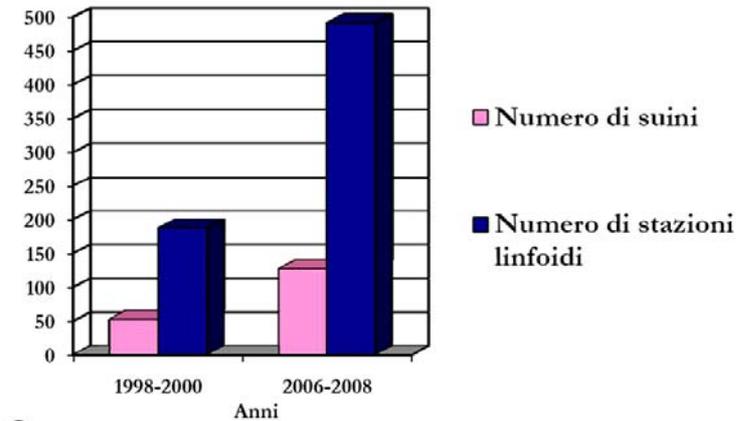
BIBLIOGRAFIA

- Ellis J., Hassard J., Clark E., Harding J., Allan G., Willson P., Strokappe J., Martin K., McNelly F., Meehan B., Todd D., Haines D. (1998) *Isolation of circovirus from lesions of pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome*. Can. Vet. J., 39, 44-51.
- Harding J.C.S., Clark E.G. (1997) *Recognizing and diagnosing Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome*. Swine Health and Prod. 5, 201-203.
- Krakovka S., Ellis J.A., McNeilly F., Gilpin D., Meehan B., McCullough K., Allan G. (2002) *Immunologic features of porcine circovirus type 2 infection*. Viral Immunol 15, 567-582.
- Marcato P.S. (1997) *Infiammazioni granulomatoze*. In: Anatomia e istologia patologica generale veterinaria, Società Editrice Esculapio, 3th ed. – Bologna. pp.340-371.
- Marcato P.S., Sidoli L., Mandrioli L., Della Salda L., Cerati C., Rolla G.L. (1999) *Indagini clinico patologiche in un focolaio di PMWS (Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome) in suini del nord Italia*. Large Animal Review, 5, 47-62.
- Sala G., Rigola S., Alborali G.L., Brocchi E., Cordioli P. (2000) *Development of monoclonal antibodies based ELISAs for the detection of antibodies against porcine circovirus type 1 and type 2*. Proceeding of the 5th International

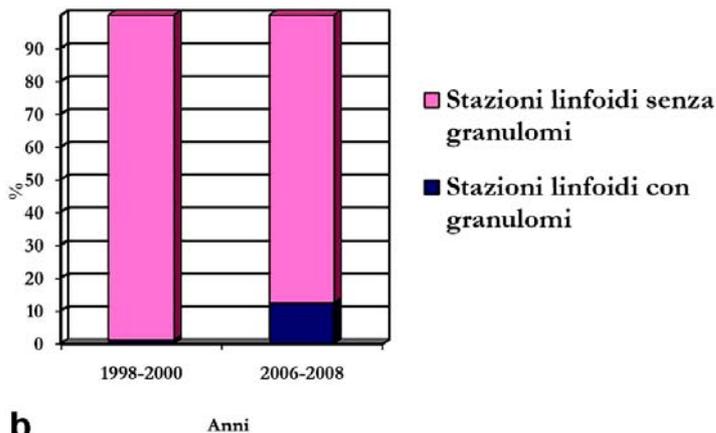
Congress of the European Society for Veterinary Virology, Brescia, Italy, 253-254.

Sarli G., Ostanello F., Morandi F., Fusaro L., Bacci B., Nigrelli A., Alborali L., Dottori M.,

Vezzoli F, Barigazzi G., Fiorentini L., Sala V., Leotti G.: Diagnosi di PMWS in Italia: risultati di 18 mesi di attività. Atti SIPAS, XXXIV, 401-410, 2008.



a



b

Figura 1. a) Casistica dei 2 periodi a confronto: 52 suini e 187 stazioni linfoidi nel periodo 1998-2000 (in media 3,6 stazioni per suino); 127 suini e 491 stazioni linfoidi nel periodo 2006-2008 (in media 3,8 stazioni per suino). b) Confronto della percentuale di granulomi delle due casistiche: 1,07% nel periodo 1998-2000 e 12,42% nel periodo 2006-2008.

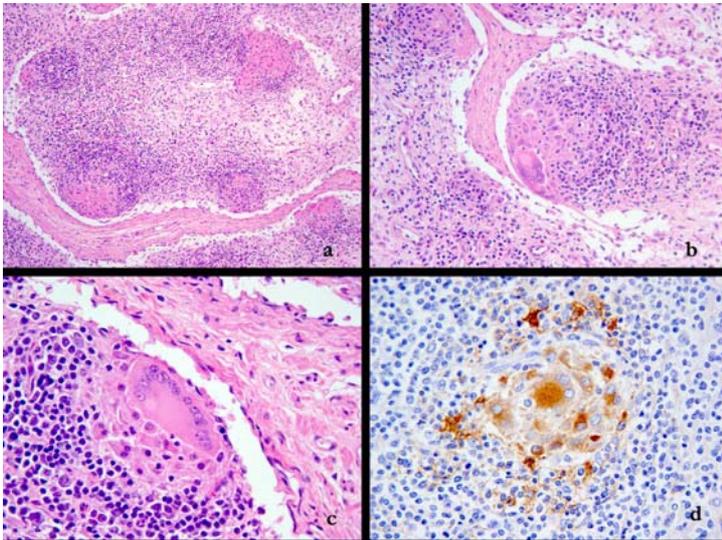


Figura 2. Suino. Linfonodo inguinale superficiale. a) deplezione del tessuto linfoide e presenza di granulomi multipli, E&E, 5x.; b e c) particolare del granuloma costituito da cellule epitelioidi e scarse cellule giganti, E&E, 10x e 40x. d) Granuloma con positività immunocitochimica per PCV2 nel citoplasma di cellule epitelioidi e giganti, 40x.

GRANULOMATOSIS OF THE LYMPHOID TISSUE IN PMWS: COMPARISON BETWEEN EPIDEMIC AND ENDEMIC PHASES OF THE DISEASE

Granulomatosis of lymphoid tissues is known in PMWS of swine due to type IV hypersensitivity. Samples of lymphoid tissues (n. 187) from 52 swine collected from 1998 to 2000 and 491 additional from 127 swine from 2006 to date were used for a comparison of the frequency of lymphoid granulomatosis between the two periods corresponding respectively to the epidemic and endemic phases of the disease. Granulomatosis of lymphoid tissues was apparent in 2 out of 187 samples (1.07%) belonging to the 1998-2000 period and in 61 out of 491 samples (12.42%) of the recent period. We found the frequency of lymphoid granulomatosis significantly influenced by the epidemiological distribution of the disease.

Key words: swine, PCV2, PMWS, lymphoid tissue, granuloma.

DISGENESIA OCULARE BILATERALE IN UN CERBIATTO (*CERVUS ELAPHUS*)

Gelmetti Daniela, Giudice Chiara*, Invernizzi Anna, Bertoletti Irene

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lombardia-Emilia Romagna-Brescia. *DIPAV, Sezione Anatomia Patologica Veterinaria, Università degli Studi di Milano*

Una guardia venatoria, ha rinvenuto a 1400 mt slm nel comune di Campodolcino (SO) la carcassa di un cerbiatto maschio di 3gg con microftalmo bilaterale (1,5 cm di diametro), opacamento corneale diffuso, blefaroschisi al canto nasale, prolasso congiuntivale in assenza di scolo congiuntivale. La carcassa era normoconformata, l'autopsia non rilevava alterazioni di rilievo e gli esami batteriologici (polmone, fegato, rene e milza) e parassitologici risultavano negativi. Entrambi i globi oculari erano fissati in formalina ed inclusi in paraffina.

All'esame istologico entrambi gli occhi mostravano nella camera anteriore, infiltrante lo stroma irideo, una cisti dermoide costituita da epitelio squamoso, lobuli di ghiandole sebacee e follicoli piliferi. Una massa di cellule fusate, stellate sparsi microtubuli immersi in una matrice mixoide occupavano parte della camera vitreale. Si rilevava inoltre distacco retinico completo, fibrosi e vascolarizzazione corneale. L'immunofenotipizzazione (pan-citocheratine, Vimentina, Gfap, NSE, MAP2, neurofilamenti, astina muscolare liscia, S100) rilevava componenti neuronali e mesenchimali. La coesistenza di elementi embrionali di differente origine depone per una disgenesia con caratteristiche sovrapponibili alla così detta microftalmia complessa della medicina umana.

Parole chiave: schwannoma, neurofibroma, calretinina, teleostei, neoplasia

BILATERAL OCULAR DISGENESIS IN YOUNG DEER (*CERVUS ELAPHUS*)

A young male deer, about 3 day-old was found dead in Campodolcino (Sondrio-Italy). The animal was affected by bilateral microphthalmus (1.5 cm in diameter), diffuse corneal opacity, eyelid coloboma at the nasal cantus, conjunctival prolapse without conjunctival secretion. No other external gross alteration was detected and necropsy revealed no internal organs lesions. Bacteriological tests (performed on lung, liver, kidneys and spleen) and parasitological examination were all negative. Ocular globes were formalin fixed paraffin embedded.

Histologically both eyes have similar alterations. A large dermoid cyst, composed by squamous epithelium, sebaceous glands and hair follicles, expanded anterior chamber and partially infiltrated and distorted iris stroma. A mass composed of spindle to stellate cells and small scattered tubules, embedded in a mixoid extracellular matrix, expanded vitreal chamber. Complete retinal detachment and corneal fibrosis and vascularization were also visible. Immunoassaying of vitreal mass (pan-cytokeratins, Vimentin, Gfap, NSE, MAP2, neurofilaments, alpha smooth muscle actin, S100) revealed both neural and mesenchymal elements. The presence of structures of different embryonal histogenesis was consistent with complex microphthalmia described in human medicine.

Key words: deer, microphthalmia, ocular dysgenesis, dermoid cyst

INUSUALI QUADRI DI PATOLOGIA SPONTANEA IN KAKARIKI FRONTEROSSA (*CYANORANPHUS NOVAZELANDIAE*)

Lanteri Giovanni¹, Marino Fabio¹, Rapisarda Giuseppe¹, Augello Antonio², Macrì Battesimo¹

¹Dip. di Sanità Pubblica Veterinaria, Università degli Studi di Messina, Polo Universitario dell'Annunziata, 98168 Messina. ²ASL Catania

Le infezioni da germi acido-alcool resistenti, talora complicate da infezioni fungine secondarie, sono state ampiamente descritte negli animali domestici, con particolare riferimento alle micobatteriosi nei volatili da gabbia. Il presente studio è stato condotto su un Kakariki fronterossa, femmina, dell'età di tre anni, deceduto improvvisamente in seguito a grave emottisi. L'esame necroscopico esterno metteva subito in evidenza un grave stato di emaciazione della carcassa. L'arto posteriore sinistro presentava una tumefazione muscolare di colore pallido. Numerosi noduli miliari, confluenti, di colorito bianco giallastro, si documentavano a carico di polmone e sacchi aerei; il fegato, diminuito di volume, mostrava un colorito pallido, così come i restanti organi della cavità celomatica. L'esame istologico ed istochimico evidenziava, a livello polmonare, diverse aree necrotiche con numerosi bacilli sparsi, contornate da macrofagi, cellule giganti ed epitelioidi, alcune delle quali replete di batteri. Negli stessi campi di osservazione, erano evidenziabili numerose ife fungine, con evidente fenomeno di Hoeppli-Splendore. Quadri sovrapponibili sono stati evidenziati in fegato, reni e intestino. Infine, quadri di osteomielite trabecolare e miosite fungina sono emersi dall'istologico sull'arto. Abbondanti depositi di sostanza amiloide erano osservabili a carico di organi e tessuti. Tali aspetti, hanno permesso di formulare una diagnosi di micobatteriosi complicata da aspergilloso. La coesistenza delle due patologie è stata già documentata nelle specie aviarie, ma non sempre è stata chiarita la causa primaria. Sebbene la suscettibilità del Kakariki alle infezioni aspergillari sia nota, non risultano descritti episodi di tubercolosi. L'infezione da micobatteri è da considerarsi primaria in considerazione della diffusione ed evoluzione della stessa, nonché per i quadri di amiloidosi, ad essa conseguenti, colti nei vari organi e tessuti.

Parole chiave: micobatteriosi, aspergilloso, *Cyanoranphus novazelandiae*, istopatologia

UNUSUAL PATHOLOGICAL FINDINGS IN *CYANORANPHUS NOVAZELANDIAE*.

Acid-fast infections, sometimes complicated by secondary mycotic infections, have been widely reported in domestic animals, especially mycobacteriosis in cage birds. This study was carried out on a red crowned parakeet, female, three y.o., suddenly dead after severe haemoptysis. At external exam a severe status of emaciation of the body was seen. The left posterior limb showed a pale muscular swelling. Several white-yellowish small nodules were seen in lungs and air sacs; liver and coelomic organs were pale in colour. Histological and histochemical exams showed in lung different necrotic areas with many bacilli spread, surrounded by macrophages, epithelioid and giant cells, sometimes filled with bacteria. In the same fields, several mycotic hyphae were showed with a sharp Hoeppli-Splendore phenomenon. Similar findings were seen in liver, kidney and intestine. Finally, trabecular osteomyelitis and mycotic myositis were showed in limb histological sections. Abundant deposits of amiloid were found in different organs and tissues. Data here reported let us to make a diagnosis of mycobacteriosis complicated by aspergillosis. The coexistence of both pathologies has already been described in avian species, although the primary infection was often unclear. Even if red crowned parakeet has been showed to be susceptible to *Aspergillus* infection, there are no reports of tuberculosis in this species. Mycobacterial infection can be considered as the primary one considering the spread and evolution of the disease, as well as for the it consequential amiloidosis found in various organs and tissues.

Key words: mycobacteriosis, aspergillosis, *Cyanoranphus novazelandiae*, histopathology

STUDIO COMPARATO SUL PROFILO BIOMOLECOLARE ED IMMUNOISTOCHIMICO DEL TUMORE A CELLULE GIGANTI DELL'OSSO (TCGo) NELLE SPECIE FELINA E CANINA

Leonardi Leonardo¹, Ciorba Alessandro¹, Susta Leonardo², Pazzaglia Laura³, Benassi Maria
Serena³

¹Dipartimento di Scienze Biopatologiche e Igiene delle Produzioni Animali e Alimentari, Facoltà di Medicina Veterinaria – Università degli Studi di Perugia – Via San Costanzo, 4 – 06126 Perugia.

²Department of Veterinary Pathology, College of Veterinary Medicine – University of Georgia – Athens, GA 30602-7388 USA. ³Laboratorio di Ricerca Oncologica, Dipartimento Italo Federico Goidanich – Istituti Ortopedici Rizzoli – Via di Barbiano 1/10, 40136 Bologna.

Il Tumore a Cellule Giganti dell'Osso (TCGo), originariamente denominato Osteoclastoma, è un tumore osseo a diversi gradi di aggressività, che possono variare da una malignità locale recidivante alle più rare forme metastatiche. Dal 1998 presso il Dipartimento di Scienze Biopatologiche e Igiene delle Produzioni Animali e Alimentari di Perugia, ha preso avvio un progetto di ricerca sui tumori ossei spontanei e non degli animali domestici. Proprio a questo anno risale la prima segnalazione di un caso di osteoclastoma nella specie felina. Da allora sono stati diagnosticati ed archiviati 15 casi, provenienti da animali appartenenti alle specie felina e canina. La costituzione di un gruppo di lavoro, di più unità operative, appartenenti sia alla Medicina Veterinaria che alla Medicina Umana, ha permesso di ottenere una serie di interessanti risultati relativi all'origine istogenetica ed al comportamento biologico comparato di questo raro tumore osseo. Frutto delle nostre indagini sono le prime osservazioni, riportate in Medicina Veterinaria, riguardanti l'espressione immunoistochimica metalloproteasica di 12 forme di TCGo primitivo del cane e del gatto e del sistema RANK/OPG/RANKL che ha consentito di valutare la capacità di invasione della matrice extracellulare e di stabilire importanti considerazioni sull'istogenesi delle principali componenti cellulari dei tumori in esame (A.I.P.Vet. 2006). Obiettivo del presente lavoro è un ulteriore approfondimento delle indagini di natura immunoistochimica concernenti nuovi aspetti biomolecolari di questa neoplasia. Le nostre osservazioni si riferiscono a 15 casi di TCGo spontaneo del gatto e del cane, che sono stati indagati con lo scopo di identificare, nella compagine neoplastica, l'espressione di CDK4, Rb, UPA e PAI-1. Nei casi oggetto del nostro studio, si è evidenziata immunoistochimicamente una diffusa espressione di questi marcatori, ad ulteriore conferma della potenziale capacità invasiva di questi tumori.

Parole chiave: Tumore a Cellule Giganti dell'osso, immunoistochimica, profilo biomolecolare.

COMPARATIVE STUDY ON BIOMOLECULAR AND IMMUNOHISTOCHEMICAL PROFILE OF CANINE AND FELINE GIANT CELL TUMOR OF BONE (GCT_B)

Giant Cell Tumor of Bone (GCT_B), originally called Osteoclastoma, is a rare tumor with different grades of aggressiveness that can vary from local recurrence to the rarer metastatic form. Our studies started in 1998 with the description of a rare case of primitive GCT_B in a cat. Over the years we have collected 15 cases from cats and dogs. This study was carried out on specimens from all of these 15 spontaneous tumors to investigate immunohistochemically the expression of CDK4, Rb, UPA and PAI-1. These results are compared with the results from studies on this tumor in human, performed in collaboration with the Orthopaedic Institute Rizzoli in Bologna, Italy. Our preliminary results in association with the results already obtained by our group suggest that the immunohistochemical expression of these markers may be correlated with the aggressiveness of GCT_B.

Key words: Giant Cell Tumor of bone, immunohistochemistry; biomolecular profile.

EVIDENZA DI FIBRE DI FLUORO-EDENITE IN POLMONI DI RODITORI SELVATICI DELL'AREA DI BIANCAVILLA (CT)

Loria Guido Ruggero, Schiavo Maria Rita, Monteverde Vincenzo, Manno Claudia, Sparacino Leo, Militello Claudia, Tamburello Anna, Di Bella Calogero, Caracappa Santo

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, Palermo, Italy

Alcune specifiche patologie croniche dell'uomo sono ormai epidemiologicamente correlate all'inquinamento ambientale da fibre di asbesto, derivante generalmente dal massivo utilizzo in passato di questi minerali nell'edilizia. Studi recenti hanno dimostrato una casistica estremamente elevata di mesotelioma pleurico nella popolazione del Comune di Biancavilla, una cittadina situata alle pendici dell'Etna nella Sicilia Orientale (CT). Studi svolti su una cava di pozzolana ubicata in vicinanza del comune etneo, hanno comprovato l'esistenza di una vena di un materiale simile all'asbesto, classificato come fluoro-edenite. In considerazione della scarsa conoscenza sulla patogenesi della malattia, sulla difficoltà nell'individuare i fattori di rischio per implementare eventuali opportune misure di prevenzione del problema, è stata attivata grazie ad un finanziamento del Ministero della Salute, una ricerca (RF SI 09/05) per lo studio di animali sentinella, residenti nella zona. Al fine di valutare la potenziale contaminazione aerogena da fibre di fluoro-edenite, sono stati monitorati roditori selvatici catturati presso differenti siti della cava. N. 32 polmoni sono stati fissati in formalina tamponata al 10%: di cui una porzione è stata inclusa in paraffina, sezionata per la colorazione con Ematossilina-Eosina ed analizzata per svelare eventuali lesioni legate a patologie polmonari. Le rimanenti porzioni di tessuto sono state raggruppate in 5 gruppi corrispondenti ad i differenti siti di prelievo: ogni gruppo è stato sottoposto a digestione con ipoclorito di sodio e filtrazione per separare la frazione inorganica. I filtri sono stati sottoposti all'analisi mediante microscopia elettronica a scansione (SEM/EDS) per la ricerca di fibre. L'esame istopatologico dei polmoni non ha riscontrato alcuna lesione. L'analisi al SEM/EDS ha rivelato la presenza di fibre di fluoro-edenite nei cinque gruppi di campioni esaminati, confermando l'ipotesi che tali fibre si possono accumulare nei polmoni dei roditori selvatici per via inalatoria ed il ruolo di questi animali come potenziali indicatori di contaminazione ambientale.

Parole chiave: Fluoro-edenite, polmone, SEM/EDS

INTRODUZIONE

L'inquinamento ambientale da fibre di asbesto, derivante generalmente dal massivo utilizzo in passato di questi minerali nell'edilizia, desta da sempre preoccupazione sanitaria (Bruno *et al.* 2007). Alcune specifiche patologie croniche dell'uomo (l'asbestosi, il mesotelioma, i carcinomi polmonari, i tumori del tratto gastro-intestinale e della laringe) sono ormai epidemiologicamente correlate a questo rischio sanitario (Paoletti *et al.* 1992). Recenti evidenze epidemiologiche (Biggeri *et al.* 2004) hanno dimostrato una casistica estremamente elevata di mesotelioma pleurico nella popolazione del Comune di Biancavilla, una cittadina situata alle pendici dell'Etna nella Sicilia Orientale (CT). Inoltre, fibre di fluoro-edenite sono state trovate nell'espettorato di soggetti colpiti da bronchite, incluse alcune casalinghe, che non operavano nel settore edile (Putzu *et al.* 2006). I dati registri hanno risvegliato l'attenzione sui fattori di rischio ambientali di Biancavilla, portando in seguito alla scoperta di un sito, alle porte della cittadina, da cui si estraevano materiali cementizi da oltre 50 anni: la cava di Monte Calvario. Il cemento della cava aveva da decenni rappresentato il materiale per l'edificazione di numerosissime strutture private e pubbliche nel comune. Studi sulla composizione dei materiali presenti nella cava comprovavano l'esistenza di una vena di un materiale simile all'asbesto, classificato come fluoro-edenite (Gianfagna *et al.* 2001). In considerazione della scarsa conoscenza sulle modalità di contaminazione e sviluppo della malattia, delle difficoltà nell'individuare i fattori di rischio per implementare opportune misure di prevenzione e di controllo del problema, è stata attivata grazie ad un finanziamento del Ministero della Salute, una ricerca (RF SI 09/05) per lo studio di animali sentinella, residenti nella zona. Al fine di valutare la potenziale contaminazione aerogena da fibre di fluoro-edenite, sono stati monitorati roditori selvatici catturati presso differenti siti della cava. Sui soggetti catturati, sono stati condotti esami autoptici al fine di evidenziare eventuali patologie correlate, ed esami di laboratorio per la ricerca diretta di tali fibre nei tessuti respiratori

MATERIALI E METODI

L'indagine si è sviluppata attraverso due distinte fasi: una fase di campo nella quale sono stati

stabiliti i siti di prelievo e il numero di trappolamenti da effettuare ed una fase di laboratorio caratterizzata dalla ricerca di fibre minerali mediante microscopia ottica ed elettronica.

Cattura dei roditori.

Il sito di ricerca era costituito dai terreni confinanti con la cava di Monte Calvario, nel Comune di Biancavilla, ove è stata individuata la fluoro-edenite (Fig. 1). L'area della cava è stata suddivisa in n. 5 distinti siti di cattura (A, B, C, D, E): in questi siti sono state poste le trappole con un segnale colorato, che consentiva di identificarle più facilmente. Le trappole (Fig. 2) una volta innescate sono state lasciate sul posto per la notte e prelevate entro le 24 ore. Il trappolamento è stato effettuato nel mese di maggio, nell'arco di una settimana. L'esca utilizzata con maggiore successo era costituita da mele o farinacei e Nutella. Una volta catturati i roditori sono stati alimentati e mantenuti in gabbie da allevamento sino al giorno dell'eutanasia. Prima di essere sacrificati, i soggetti sono stati identificati dal punto di vista fenotipico e registrate le misurazioni biometriche. Gli esami autoptici erano focalizzati alla ricerca delle lesioni della cavità toraco-addominale e dell'apparato respiratorio (in particolare polmoni e linfonodi tributari).

Esami di laboratorio.

Sono stati catturati un totale di n. 32 roditori selvatici. Il polmone è stato prelevato "in toto" con i linfonodi, fissato in formalina tamponata al 10% e secondariamente incluso in paraffina secondo procedure standard (Luna, 1968). I linfonodi e una parte del polmone sono stati processati per indagini istologiche: sezioni al microtomo, colorate con Ematossilina-Eosina, sono state analizzate per svelare eventuali lesioni legate a patologie polmonari o pleuriche (Martinez *et al.* 2006). Le rimanenti porzioni di tessuto fissate in formalina, sono state raggruppate in 5 gruppi (A, B, C, D, E) corrispondenti ad i differenti siti di prelievo nella cava per la ricerca delle fibre tramite microscopia elettronica a scansione (SEM/EDS) (Fig. 3). I campioni sono stati preparati con un metodo atto ad evidenziare le fibre nel tessuto polmonare di mammiferi domestici (Belluso *et al.*, 2006). Il polmone è stato digerito con una soluzione di ipoclorito di sodio al 6-14%, in rapporto tessuto/soluzione di 1:60, per 72h a 60°C per

eliminare la parte organica. La componente non solubilizzata è stata recuperata mediante filtrazione su membrana porosa (MCE- mixed cellulose esters) di 0.45 micron ed un diametro di 25 mm (Millipore, Italy). Per l'osservazione mediante microscopia elettronica a scansione con Microscopio SEM/ISIS (mod.: LEO 420 equipaggiato con spettrometro a raggi X a dispersione di energia EDS OXFORD Isis), i filtri sono stati incollati su porta campioni in alluminio (*stubs*) da 25 mm di diametro, a mezzo di dischetti di nastro biadesivo in grafite, e posizionati in uno Sputter in oro. Sono stati eseguiti 2 cicli di sputtering da 60 secondi l'uno, ruotando il campione di 90° tra un ciclo e l'altro allo scopo di assicurare un'analisi più uniforme possibile della sezione. I parametri operativi del SEM sono i seguenti: Tensione 20KV; Corrente 100 picoampere; Distanza di lavoro 20 mm; Ingrandimenti 1000X; N. campi ispezionati 300; N. campi analizzati 100; Area totale ispezionata 9 mm²; Area totale analizzata 3 mm²; Percorso stage X: analisi-ispezione-ispezione (10 campi); Percorso stage Y: lineare e continuo (10 campi).

RISULTATI

L'esame necroscopico dei roditori esaminati non ha rilevato alcuna alterazione patologica degli organi interni. L'esame istopatologico dei polmoni e dei linfonodi non ha riscontrato alcuna patologia, né alcuna lesione tissutale degli organi esaminati. Risultati positivi sono stati ottenuti invece, per quanto riguarda la ricerca delle fibre tramite microscopia elettronica (SEM/EDS Fig. 4, 5 e 6): è stata evidenziata la presenza di fibre di fluoro-edenite nei cinque gruppi di campioni esaminati, confermando l'ipotesi che tali fibre si possono accumulare nei polmoni dei roditori selvatici dopo essere penetrate per via inalatoria. Inoltre l'analisi al SEM/EDS ha rivelato la presenza in alcuni campioni, di rare fibre di tipo vegetale o elementi riferibili a pollini.

DISCUSSIONE

I risultati ottenuti confermano il ruolo di questa specie animale come potenziale indicatore di contaminazione ambientale, utile per monitorare l'efficacia degli interventi di bonifica nelle aree a rischio. Risulta auspicabile, a nostro avviso, proseguire i campionamenti per ottenere un numero maggiore di roditori da analizzare, al fine di ottenere risultati maggiormente significativi.

Inoltre è importante meglio definire l'opportunità di utilizzare anche altre specie animali (conigli, volatili domestici e selvatici seppure nei limiti legati all'utilizzo di queste specie) come probabili indicatori.

BIBLIOGRAFIA

- Altomare A. D., Vaslet C. A., Skele K. L., De Rienzo A., Derarajan K., Jhanwar S.C., McClatchey A. I., Kane A. B., Testa J. R. (2005) A Mouse Model Recapitulating Molecular Features of Human Mesothelioma. *Cancer Research* Vol. 65, 8090-8095. 2
- Belluso E., Bellis D., Fornero E., Capella S., (2006) Assessment of Inorganic Fibre Burden in Biological samples by Scanning Electron Microscopy – *Energy Dispersive Spectroscopy. Microchip Acta*. 3
- Biggeri A., Pasetto R., Belli S., Bruno C., Di Maria G., Mastrantonio M., Trinca S., Uccelli R., Comba P. (2004) Mortality from chronic obstructive pulmonary disease and pleural mesotelioma in an area contaminated by natural fiber (floro-edenite). *Scand. J. Work. Environ. Health*. 30 (3):249-252. 4
- Bruno C., Comba P., Zona A. (2007) Biancavilla: da un sospetto cluster alla definizione di un sito di interesse nazionale per la bonifiche. *Atti del Convegno Nazionale Anfiboli Fibrosi: nuove problematiche relative al rischio ambientale e sanitario*. Roma 27-28 aprile 2007: 18-19. 5
- De Nardo P., Bruni B., Paletti L., Pasetto R., Sirianni B. (2004) Pulmonary fibre burden in sheep living in the Biancavilla area (Sicily): preliminary results. *Science of the Total Environment* 325, 51-58. 6
- Gianfagna A., Oberti R. (2001) Fluoro-edenite from Biancavilla (Catania, Sicily, Italy): cristal chemistry of a new amphibole end-member. *Am. Mineralogist* 86: 1489-1493. 7
- Luna L.G. (1968) Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology, 3rd ed., Editor, McGraw Hill, New York. 8
- [Martinez G., Loreto C., Rapisarda V., Masumeci G., Valentino M., Carnazza M.L.](#), (2006) Effects of exposure to fluoro-edenite fibre pollution on the respiratory system: an in vivo model. *Histology and Histopathology* 21: 595-601. 9
- Paoletti I., Falchi M., Batisti D., Carrieri M. P., Petrelli M. G., Caiaiella C., Donelli G. (1991)

Mineral lung burden of an urban population.
Atmos. Environ. 25 (B): 381-385. 10

- Putzu M. G., Bruno C., Zona A., Massiccio M., Pasetto R., Piolatto P. G., Comba P., (2006) Fluoro-edenitic fibres in the sputum of subjects from Biancavilla (Sicily): a pilot study.
Environmental Health: A Global Access Science Source, 5:20. 11

- Spugnini E. P., Cardillo I., Verdina A., Crispi S., Saviozzi S., Calogero R., Nebbioso A., Altucci L.,

Cortese G., Galati R., Chien J., Shridhar V., Vincenzi B., Citro G., Cognetti F., Sacchi A., Baldi A. (2006) Piroxicam and Cisplatin in a Mouse Model of Peritoneal Mesothelioma.
Clinical Cancer Research Vol. 12, 6133-6143.

RINGRAZIAMENTI: Si ringrazia la Ditta S.I.R.Am srl di Milazzo (ME) per il significativo contributo nella ricerca e identificazione delle fibre.



Figura 1: Cava di Monte Calvario, Biancavilla (CT)



Figura 2: Trappola



Figura 3: Microscopio elettronico a scansione con rivelatore EDS

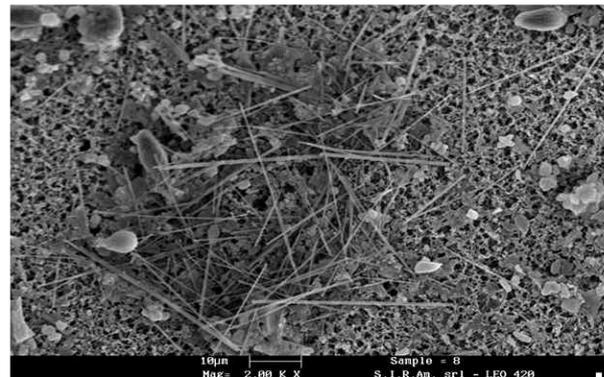


Figura 4: Immagine al SEM di fibre di fluoro-edenite ottenute dai campioni

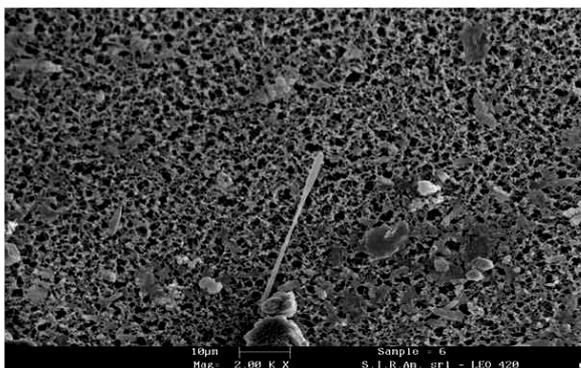


Figura 5: Immagine al SEM di fibre di fluoro-edenite ottenute dai campioni

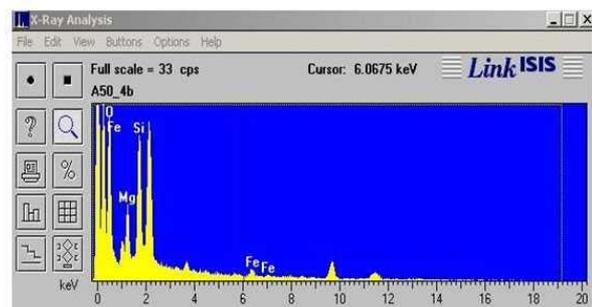


Figura 6: spettro EDS del campione contenente fibre di fluoredenite

DETECTION OF FLURO-EDENITE IN RODENT’S LUNGS IN BIANCAVILLA AREA (CT)

Authors report laboratory investigation on wild rodents population trapped in an fluoro-edenite contaminated area, located in the Biancavilla district (Sicily). Portions of lungs (right side) belonging 32 rodents have been examined by standard histological methods. Remaining left portions were previously treated with hypochlorite sodium solution, filtered in order to recover possible inorganic fibres. Filters were analyzed by scanning electron microscopy (SEM/EDS). Negative results were found in lung screened by histological analysis. Instead, the SEM/EDS method showed the heavy contamination from fluoro-edenite in the samples from some mice and rats caught in the “at risk” area. The study confirmed the role of wild rodents as suitable indicator of human pollution and as reliable sentinels to monitor potential environmental risks

Key words: Fluoro-edenite, lung, SEM/EDS

LESIONI PARASSITARIE OSSERVATE IN CIGNI REALI (*CYGNUS OLOR*) IN SICILIA. DESCRIZIONE DEL CASO

Manno Claudia¹, Pizzo Liboria¹, Ghisleni Gabriele², Monteverde Vincenzo¹, Loria Guido Ruggero¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia

² Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Università di Milano
guidoruggero.loria@izssicilia.it

Nell'inverno 2006, nell'ambito dell'attività di sorveglianza effettuata in Sicilia durante il primo focolaio di influenza aviaria, sono stati esaminati un totale di dodici cigni reali appartenenti ad un più vasto gruppo di volatili, tra i quali alcuni confermati positivi per infezione da H5N1. Il focolaio è stato osservato sulle rotte migratorie lungo la costa di Catania e Siracusa. Tutti i cigni sono stati catturati e sacrificati con metodi eutanasi ed immediatamente indagati per la presenza del virus influenzale e/o eventuali lesioni sospette. L'esame ispettivo esterno non rilevava la presenza di lesioni superficiali. L'esame necroscopico evidenziava all'apertura della cavità toracica, lesioni sospette caratterizzate da molteplici, diffusi, piccoli focolai emorragici sul miocardio in quattro soggetti. All'esame istologico tali lesioni del tessuto muscolare erano classificabili come focolai di miocardite infiltrati di granulociti eosinofili e macrofagi con all'interno la presenza di forme parassitarie. Le femmine adulte presentavano un utero repleto di numerose microfilarie. Tali reperti erano associati a fibrosi interstiziale ed aspetti degenerativo-emorragici. E' stata inoltre rilevata una diffusa vasculite necrotizzante con infiltrazione di macrofagi, eterofili, e presenza di microfilarie all'interno delle lesioni nel parenchima del miocardio e nei vasi. Il parassita in causa è stato identificato mediante le chiavi morfologiche, come *Sarconema eurycerca*. I soggetti esaminati sono risultati negativi per il virus H5N1. Un dato interessante emerso dall'indagine è il riscontro del parassita in quattro soggetti (30%). L'alta prevalenza della filariosi osservata in questa specie selvatica e la presenza di lesioni legate all'azione del parassita conferma la patogenicità della filariosi cardiaca. La presenza di una vasculite necrotizzante suggerisce inoltre l'instaurarsi di un meccanismo patogenetico complesso probabilmente riferibile a ipersensibilità immuno-mediata (tipo III).

Parole chiave: Cigno reale, Sicilia, *Sarconema*

INTRODUZIONE

Nell'inverno 2006, nell'ambito dell'attività di sorveglianza effettuata in Sicilia durante il primo focolaio di influenza aviaria, sono stati esaminati un totale di dodici cigni reali appartenenti ad un più vasto gruppo di volatili, tra i quali alcuni confermati positivi per infezione da H5N1. Il focolaio è stato osservato sulle rotte migratorie lungo la costa di Catania e Siracusa. Tutti i cigni sono stati catturati e sacrificati con metodi eutanascici ed immediatamente indagati per la presenza del virus influenzale e/o eventuali lesioni sospette. L'esame ispettivo esterno non rilevava la presenza di lesioni superficiali. L'esame necroscopico evidenziava all'apertura della cavità toracica, lesioni sospette caratterizzate da molteplici, diffusi, piccoli focolai emorragici sul miocardio in quattro soggetti. All'esame istologico tali lesioni del tessuto muscolare erano classificabili come focolai di miocardite infiltrati di granulociti eosinofili e macrofagi con all'interno la presenza di forme parassitarie. Le femmine adulte presentavano un utero repleto di numerose microfilarie. Tali reperti erano associati a fibrosi interstiziale ed aspetti degenerativo-emorragici. E' stata inoltre rilevata una diffusa vasculite necrotizzante con infiltrazione di macrofagi, eterofili, e presenza di microfilarie all'interno delle lesioni nel parenchima del miocardio e nei vasi. Il parassita in causa è stato identificato mediante le chiavi morfologiche, come *Sarconema eurycerca*. I soggetti esaminati sono risultati negativi per il virus H5N1. Un dato interessante emerso dall'indagine è il riscontro del parassita in quattro soggetti (30%). L'alta prevalenza della filariosi osservata in questa specie selvatica e la presenza di lesioni legate all'azione del parassita conferma la patogenicità della filariosi cardiaca. La presenza di una vasculite necrotizzante suggerisce inoltre l'instaurarsi di un meccanismo patogenetico complesso probabilmente riferibile a ipersensibilità immuno-mediata (tipo III).

MATERIALI E METODI

Nell'inverno 2006, durante le attività di sorveglianza effettuate in seguito al primo focolaio sospetto di influenza aviaria, venivano esaminati un totale di dodici cigni appartenenti ad un più vasto gruppo di volatili in precedenza confermati come positivi per l'infezione da H5N1. Il focolaio veniva osservato sulle rotte migratorie

lungo la costa di Catania e Siracusa, un'area caratterizzata da ambienti umidi che gli uccelli migratori utilizzano come aree di svernamento in tutto il percorso Nord-Sud.

Tutti i cigni venivano catturati ed abbattuti con metodi eutanascici ed indagati per presenza di eventuali lesioni sospette tramite esame necroscopico. Per la ricerca del virus si procedeva con gli esami di laboratorio ufficiali per la conferma di Influenza aviaria: Test di real time polimerasi (qRT-PCR) e culture per il virus dell'influenza. In alcune carcasse si osservavano lesioni emorragiche cardiache, in assenza di lesioni specifiche per influenza. Una volta risultati negativi ai test di laboratorio, i campioni venivano inoltrati per ulteriori indagini istopatologiche per accertarne la natura.

I frammenti di tessuto miocardico venivano fissati in formalina tamponata al 10%, processati, disidratati in alcool ed inclusi in paraffina secondo procedure standard. Le sezioni ottenute al microtomo, di circa 2-3 μ m, dopo sparaffinatura, venivano colorate con Ematossilina ed Eosina.

Per l'identificazione ed eventuale classificazione dei parassiti osservati sono state utilizzate le chiavi di lettura descritte da Gardiner, 1998; Norman et al. 1956; Van Bolhuis et al. 2004, Frederick and Vande Vusse 1979.

RISULTATI E DISCUSSIONE

All'esame necroscopico, tutti i cigni presentavano un buono stato di nutrizione con moderata presenza di grasso nel sottocute e nelle cavità. Non si osservavano lesioni superficiali. All'apertura della cavità toracica, l'esame necroscopico rivelava, in quattro dei dodici cigni, lesioni sospette caratterizzate da molteplici, diffusi, piccoli focolai sul miocardio (1-3 mm Ø) giallo-beige, (necrotico-emorragico).

Soltanto in seguito agli esami istologici si potevano interpretare le lesioni osservate: il tessuto miocardico mostrava infatti focolai di miocardite che circondavano forme parassitarie, infiltrati da granulociti eosinofili e da macrofagi. Le forme parassitarie adulte erano caratterizzate da un diametro di circa 600-800 μ m di diametro, cuticola dello spessore di 2-3 μ m, strato muscolare di tipo "coelomyarian" e una cavità centrale (pseudoceloma). In alcuni nematodi adulti di sesso femminile era visibile l'utero voluminoso repleto di numerose microfilarie (Figura 1). Gli episodi di calcificazione dei focolai adiacenti ai

parassiti erano rari (Figura 1). La fibrosi interstiziale ed aspetti degenerativi sono stati osservati in tutto il miocardio, accompagnati da numerosi focolai emorragici con depositi di emosiderina (Figura 2). E' stata inoltre rilevata una diffusa vasculite necrotizzante (necrosi fibrinoide) con infiltrazione di macrofagi e eterofili (Figura 3). Le microfilarie (circa 100µm di lunghezza) erano presenti nel parenchima del miocardio e nei vasi. Tutti i volatili sono risultati negativi per il virus H5N1. Forme adulte e larvali di Cestodi, classificate come Cyclophyllidians, ed una cisti parassitaria renale causata da un trematode (*Schistosoma* spp.) erano contemporaneamente presenti in due dei quattro cigni. Tutti i volatili sono risultati negativi per il virus H5N1 (Figura 5). Il parassita osservato in lesioni cardiache possedeva caratteristiche morfologiche ascrivibili a *Sarconema eurycerca*. Un dato interessante emerso dall'indagine è l'alta prevalenza della filariosi in questa specie selvatica, che mostra sia le microfilarie che i parassiti adulti in 4 dei 12 uccelli raccolti (30% di prevalenza) (Figura 4 e Figura 6).

Il Genere *Sarconema* appartenente alla Famiglia Filarioidea, sono parassiti Nematoda di uccelli migratori quali anatidi, oche e cigni. Sono stati identificati in cigni fischianti (*Cygnus colombianus*) in Nord America, nel cigno trombettiere (*Olor buccinator*), nelle oche canadesi (*Branta canadensis*) (Kluge, 1967; MacNeill, 1975), in oche della specie *Anser albifrons* (Holden e Sladen, 1968). In alcune regioni degli Stati Uniti d'America *Sarconema eurycerca* (Wehr, 1939) è stato trovato in alta prevalenza ($\geq 17\%$) in cigni fischianti. Durante un sondaggio, Cole (2001) ha osservato una prevalenza variabile (4-20%) di positività su strisci di sangue prelevati da uccelli apparentemente sani. Sino ad ora non abbiamo segnalazioni del parassita in altre specie di cigno o eventuali focolai in Europa.

Sarconema eurycerca è caratterizzato da un ciclo biologico che richiede uno stadio larvale nell'ospite intermedio (*Trinoton anserinum*) che assumerà con la puntura le microfilarie rilasciate dalle femmine adulte del parassita ("heartworm") nel torrente sanguigno dell'ospite definitivo (gli uccelli). I pidocchi ematofagi alimentandosi successivamente su altri individui, diffondono l'infezione. Una volta nel torrente circolatorio, le larve migrano verso il miocardio, e completano il loro ciclo raggiungendo la maturità sessuale e producendo nuove microfilarie da liberare nel

sangue dell'ospite (Cole, 2001). Anche se sono riportati casi di infestazioni asintomatiche (Sladen, 1968), *Sarconema eurycerca* è considerato un parassita patogeno per i cigni adulti causa di insufficienza cardiaca, legata alle lesioni degenerative e necrotiche nel tessuto muscolare e mortalità (Kluge, 1967).

CONCLUSIONI

La presenza di lesioni cardiache associate a parassiti conferma la patogenicità della filariosi cardiaca. La presenza di vasculite necrotizzante suggerisce l'instaurarsi di un meccanismo patogenetico complesso di ipersensibilità immuno-mediata (di tipo III).

In Italia l'allarmismo e l'impatto emotivo causato dall'influenza aviaria ed il rischio di focolai registrati in specie selvatiche causati da virus H5N1-HPAI (ceppo ad alta patogenicità), ha risvegliato l'attenzione sull'ecologia e patologia delle specie migratrici e soprattutto del cigno reale (*Cygnus olor*). E' un dato di fatto che l'isolamento del virus in Italia e in Sicilia da uccelli migratori sia stato nel 100% dei casi da Cigni, confermando il preoccupante ruolo di questa specie quale *reservoir* del virus in Europa. Questa esperienza ha sottolineato il rinnovato interesse per le specie migratorie e la loro potenziale importanza nella diffusione di zoonosi ad alto rischio, come già osservato in altre epidemie umane e animali (Anon, 1999), inoltre ha fornito un contributo interessante sulle malattie parassitarie di queste specie, meno note in patologia aviaria e potenzialmente a rischio per le specie domestiche.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Anon (1999). West Nile like viral encephalitis. New York *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 48, pp. 890-892.
- [2] Cole R.A. (2001). Heartworm of swans and geese. In: Field manual of wildlife diseases. General field procedures and diseases of birds. Biological resource division information and technology report (1999-2001) U.S. Department of the interior, U.S. Geological survey, M. Friend and J.C. Franson Editors, Washington DC, pp. 233-234.
- [3] Frederick J. & Vande Vusse (1979). Host-parasite relations of *Dendritobilharzia pulverulenta* (Trematoda:Schistosomatidae) and anatids. *J Parasitol* 65(6), pp. 894-897.

[4] Gardiner C.H., Fayer R.; Dubey J.P. (1998). An Atlas of Protozoan Parasites in Animal Tissues - Second Edition, Armed Forces Institute of Pathology ISBN: pp. 1-88.

[5] Holden B.L. & Sladen W.J.L. (1968). 1968 Heart Worm, *Sarconema eurycerca*, Infection in Whistling Swans, *Cygnus columbianus*, in Chesapeake Bay. Bull. Wildlife Disease Assoc. Vol. 4: pp. 126-128.

[6] Kluge J.P. (1967). Avian Parasitic (*Sarconema eurycerca*) pancarditis. Bull. Wildlife Disease Assoc. Vol. 3: pp. 114-117.

[7] MacNeill A.C. (1975). Heartworm, *Sarconema* sp. Infection in a whistling swan, *Olor columbianus*. Can. Vet. Journal. Vol. 16, no. 3: pp. 82-83.

[8] Norman D.L., Clark D.T. & Hanson L.E. (1956). Encephalitis in a swan due to *Dendrobilharzia* sp. (Trematoda; Schistosomatidae). The Journal of Parasitology; pp. 496-500.

[9] Van Bolhuis G.H., Rijks J.M., Dorrestein G.M., Rudolfova J., Van Dijk M. & Kuiken T. (2004). Obliterative Endophlebitis in mute Swans (*Cygnus olor*) caused by *Trichobilharzia* sp. (Digenea: Schistosomatidae) Infection. Vet Pathol 41, pp. 658-665.

[10] Wehr E. (1939). New genera and species of Filaroidea. III. *Sarconema eurycerca* n. gen., n. sp. Proc. Helminthol. Soc. Wash. 6: pp. 95-97.

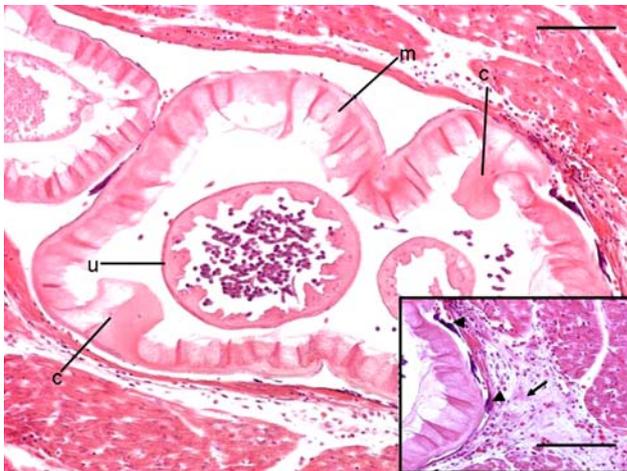


Figura 1 : *Sarconema eurycerca* nel miocardio del cigno. Ematossilina ed Eosina, bar = 35µm.

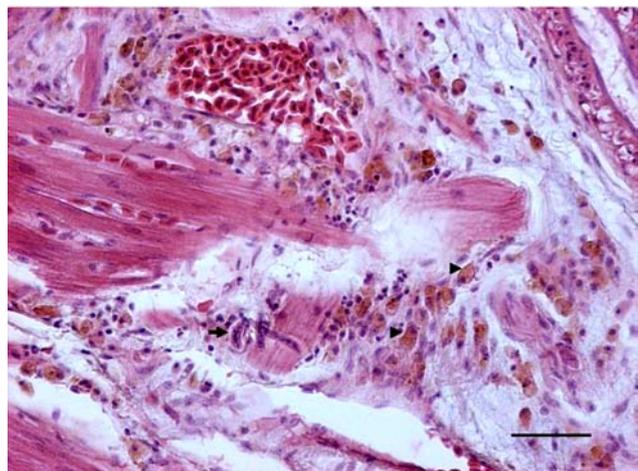


Figura 2 : Microfilarie nel miocardio (freccia), cambiamenti degenerativi e focolai emorragici contenente emosiderina (freccia), Ematossilina ed Eosina, bar = 35µm.

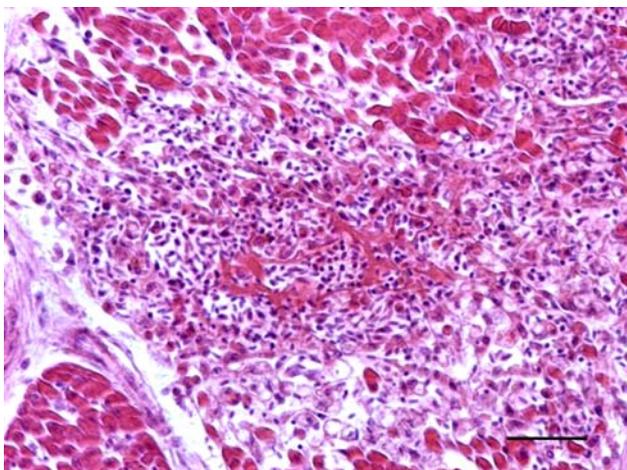


Figura 3: Vasculite necrotizzante (necrosi fibrinoide) Ematossilina ed Eosina, bar = 50 µm.

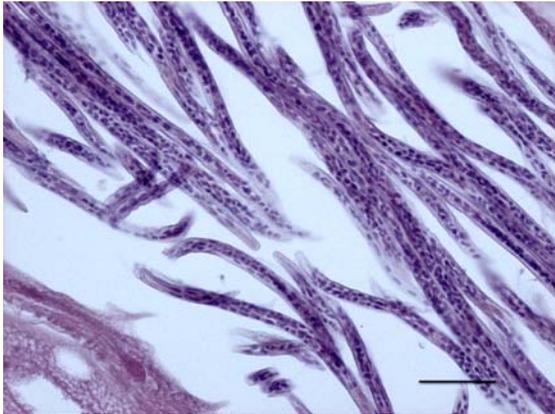


Figura 4: Microfilarie nel miocardio Ematossilina ed Eosina, bar = 50 µm.

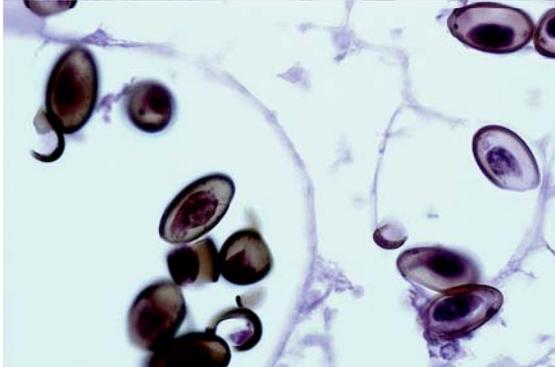


Figura 5: Uova di trematode *Schistosoma spp.* Ematossilina ed Eosina, bar =50 µm.



Figura 6: Nematode adulto di *Sarconema* entro il miocardio ed endocardio Ematossilina ed Eosina bar =50 µm.

PARASITIC LESIONS DETECTED IN MIGRATORY MUTE SWAN (*CYGNUS OLOR*) IN SICILY. CASE REPORT

During surveillance activities implemented in the year 2006, on the first outbreak of avian flu, observed in the coastal areas of Eastern Sicily, a total of twelve swans, belonging a larger group of birds previously confirmed as positive for H5N1 infection, have been examined by histology. The swans were trapped, euthanatized and monitored for suspected lesions by autopsy. Four birds showed internal lesions characterised by multiple, scattered, small myocardial haemorrhagic lesions. Histological sections showed focal myocarditis with heterophilic and macrophagic infiltration surrounding adult parasites. Interstitial fibrosis, degenerative changes and scattered necrotizing vasculitis were also observed. Parasites showed morphological characteristic relate to *Sarconema eurycerca*. Several microfilarie were present in the myocardium and vessels. All birds were negative for H5N1 influenza virus. The high prevalence of filariosis in this outbreak (30% of swans) is an unusual finding and actually, lesions found relate to parasites detection supports pathogenicity of filariosis in swans. Moreover, necrotizing vasculitis suggests an immune complex-mediated: hypersensitivity pathogenic mechanism (Type III).

Key words: Mute swan, Sicily, *Sarconema*

VALUTAZIONE QUALI-QUANTITATIVA DELL'INNERVAZIONE DELLE PLACCHE DEL PEYER ILEALI IN OVINI DI RAZZA SARDA INDENNI O AFFETTI DA SCRAPIE

Marruchella Giuseppe¹, Ligios Ciriaco², Baffoni Marina¹, Cancedda Giovanna Maria²,
Madau Laura², Chiocchetti Roberto³, Clavenzani Paolo³, Lalatta-Costerbosa Giovanna³, Di
Guardo Giovanni¹

¹Università degli Studi di Teramo, Facoltà di Medicina Veterinaria, Dipartimento di Scienze Biomediche Comparate, Teramo; ²Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna "G. Pegreffi", Sassari; ³Università degli Studi di Bologna, Facoltà di Medicina Veterinaria, Dipartimento di Morfofisiologia Veterinaria e Produzioni Animali, Ozzano Emilia (Bologna)

Le placche del Peyer (PPs) ed il sistema nervoso enterico (ENS) svolgono un ruolo chiave nelle fasi più precoci della patogenesi della scrapie ovina. Restano tuttavia da chiarire i meccanismi attraverso cui il prione della scrapie (PrP^{Sc}) colonizza i plessi dell'ENS.

Obiettivo del presente studio è stato valutare quali-quantitativamente l'innervazione delle PPs ileali in 29 ovini di razza Sarda (12 animali scrapie-free di circa 2 mesi d'età, di cui 4 ARQ/ARQ, 4 ARR/ARQ e 4 ARR/ARR; 12 ovini scrapie-free d'età compresa fra 2 e 4 anni, di cui 3 ARQ/ARQ, 7 ARR/ARQ e 2 ARR/ARR; 5 animali affetti da scrapie clinicamente manifesta, tutti ARQ/ARQ).

Dai suddetti ovini l'ileo terminale è stato prelevato e processato per le successive indagini morfologiche. L'innervazione è stata valutata immunostochimicamente, utilizzando un anticorpo (Ab) policlonale anti-PgP9.5 (*marker* pan-neuronale) ed un Ab monoclonale anti-TH (*marker* della componente simpatica), mentre per la ricerca della PrP^{Sc} è stato impiegato l'Ab monoclonale F99/97.6.1.

Tutti i suddetti ovini hanno mostrato la presenza di un discreto numero di fibre nervose in seno alle PPs, localizzate pressoché esclusivamente nel tessuto linfatico e nello stroma interfollicolare, mentre è risultata del tutto occasionale l'osservazione di fibre intrafollicolari, senza apparenti differenze fra follicoli con e senza PrP^{Sc}. Negli animali adulti, sia indenni che affetti da scrapie, è stata altresì rilevata la presenza di fibre a ridosso dell'epitelio follicolo-associato. La componente TH⁺ contribuiva solo in minima parte all'innervazione delle PPs.

Dai risultati delle nostre indagini non sembrano emergere differenze significative nell'innervazione delle PPs legate al genotipo ed all'età degli animali. Infine, all'accumulo di PrP^{Sc} non sembra corrispondere una variazione quali-quantitativa dell'innervazione delle PPs ileali.

Nota: lavoro eseguito con contributo erogato dal MIUR (PRIN 2006)

Parole chiave: scrapie, ovini, placche del Peyer, sistema nervoso enterico, patogenesi

QUALI-QUANTITATIVE EVALUATION OF ILEAL PEYER'S PATCHES INNERVATION IN SCRAPIE-FREE OR SCRAPIE-AFFECTED SARDA BREED OVINES

Although Peyer's patches (PPs) and the enteric nervous system (ENS) play a key role in early sheep scrapie pathogenesis, little is known on the kinetics of ENS plexuses colonization.

This study was aimed at quali-quantitatively evaluating ileal PP innervation in 29 Sarda breed ovines (12 scrapie-free, 2 months-old lambs, 4 ARQ/ARQ, 4 ARR/ARQ and 4 ARR/ARR, respectively; 12 scrapie-free, 2-4 years-old sheep, 3 ARQ/ARQ, 7 ARR/ARQ and 2 ARR/ARR, respectively; 5 ARQ/ARQ scrapie-affected sheep).

Terminal ileum was collected and processed for routine histology from all animals under study. Ileal PP innervation was immunohistochemically evaluated by means of an anti-PgP9.5 (pan-neuronal marker) polyclonal antibody (Ab) and of an anti-TH (sympathetic innervation marker) monoclonal Ab. Moreover, PrP^{Sc} immunohistochemistry was carried out by means of the F99/97.6.1 monoclonal Ab.

Quite a developed network of fibres was detected within PPs, almost exclusively located in the interfollicular lymphoid tissue and stromal component. Intrafollicular fibres could be very rarely observed, with no apparent differences in the innervation rate being found between scrapie-free and scrapie-affected sheep. In adult animals, both scrapie-free and scrapie-affected, nerve fibres could be detected close to the follicle-associated epithelium. Furthermore, the TH⁺ component was very limited.

In conclusion, no significant differences in ileal PP innervation seem to exist in relation to PrP genotype, age and PrP^{Sc} deposition within PP follicles.

Key words: scrapie, sheep, Peyer's patches, enteric nervous system, pathogenesis

RUOLO DELL'ENZIMA 5-LIPOSSIGENASI (5-LOX) NELLA PATOGENESI DELLA BRONCOPOLMONITE VERMINOSA DEL SUINO: INDAGINI IMMUNOISTOCHEMICHE E BIOCHIMICHE

Marruchella Giuseppe, Giacomini-Stuffler Roberto, Baffoni Marina, Maccarrone Mauro

Università degli Studi di Teramo, Facoltà di Medicina Veterinaria, Dipartimento di Scienze Biomediche Compare, Piazza Aldo Moro 45, 64100 – Teramo (Italia)

La 5-lipossigenasi (5-LOX) ha un ruolo chiave nella sintesi dei leucotrieni, metaboliti dell'acido arachidonico in grado di svolgere molteplici attività biologiche.

Il presente studio si propone di valutare il coinvolgimento della 5-LOX nella patogenesi della broncopolmonite verminosa del suino.

Sono stati oggetto di indagine 5 suini affetti da broncopolmonite verminosa e 5 soggetti sani di controllo. Campioni di tessuto polmonare sono stati fissati in formalina e processati per le indagini istopatologiche ed immunohistochemiche, volte a valutare l'espressione della 5-LOX. Ulteriori campioni di parenchima polmonare sono stati conservati a -80°C per le indagini immunobiochimiche (Western blotting) e di cinetica enzimatica. Infine, si è proceduto alla quantificazione del leucotriene B₄ (LTB₄).

Le indagini immunohistochemiche hanno evidenziato l'espressione della 5-LOX nell'epitelio bronchiolare dei soggetti di controllo. Nei suini affetti da broncopolmonite verminosa si è osservata un'intensa immunoreattività nei confronti della 5-LOX, limitata, tuttavia, ad alcuni focolai di infiammazione granulomatosa ed eosinofila. Tale immunoreattività era particolarmente pronunciata nelle cellule della muscolatura liscia bronchiolare. L'espressione della 5-LOX era, inoltre, dimostrabile in altri citotipi: epitelio bronchiolare, macrofagi, pneumociti, leucociti e condrociti.

Le indagini biochimiche hanno confermato la presenza della 5-LOX e dell'LTB₄ nei tessuti in esame, senza evidenziare differenze significative fra soggetti sani e patologici.

I risultati delle nostre indagini indicano che diversi citotipi possono esprimere livelli elevati di 5-LOX, contribuendo alla produzione di leucotrieni. Riteniamo di particolare interesse l'espressione della 5-LOX da parte delle cellule della muscolatura liscia bronchiolare, il che potrebbe contribuire alla loro iperplasia ed ipertrofia attraverso un meccanismo di tipo autocrino.

Parole chiave: suino, broncopolmonite verminosa, patogenesi, 5-lipossigenasi, leucotrieni

5-LIPOXYGENASE (5-LOX) IN PORCINE PARASITIC BRONCHOPNEUMONIA: IMMUNOHISTOCHEMICAL AND BIOCHEMICAL INVESTIGATIONS

Leukotrienes are products of the 5-lipoxygenase (5-LOX) pathway of arachidonic acid metabolism.

This study aims at evaluating the role of 5-LOX in the pathogenesis of porcine parasitic bronchopneumonia. Five pigs affected by parasitic bronchopneumonia and 5 healthy controls were investigated. Lung samples were processed for histopathological and immunohistochemical investigations, in order to evaluate the expression of 5-LOX. Additional samples were stored at -80°C for biochemical and immunobiochemical investigations.

Specific 5-LOX-immunolabelling was observed in bronchiolar epithelial cells from control animals. Pigs affected by parasitic bronchopneumonia showed a strong 5-LOX immunoreactivity, which was confined to small foci of granulomatous and eosinophilic pneumonia. Such immunolabelling was most pronounced within the bronchiolar musculature, but 5-LOX was also detected within bronchiolar epithelial cells, macrophages, pneumocytes, leukocytes and chondrocytes.

Biochemical investigations demonstrated 5-LOX and its leukotriene B₄ product in all tissues under study, with no difference between normal and pathologic samples.

Our results show that many cytotypes can express 5-LOX, and suggest that leukotrienes could contribute to the bronchiolar musculature hyperplasia/hypertrophy by means of an autocrine loop.

Key words: pig, parasitic bronchopneumonia, pathogenesis, 5-lipoxygenase, leukotrienes

DIPROSOPUS TETRAOPHTALMUS IN UN VITELLO: ASPETTI ANATOMO-PATOLOGICI E RADIOGRAFICI

Mazzullo Giuseppe*, Vanadia Bartolo Antonello, Vanadia Bartolo Donatella**, Di Martino Vincenzo**, Macri Francesco***

**Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria, Sezione di Patologia Generale e Anatomia Patologica, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Messina. **Liberi Professionisti, Catania*

Le Diprosopie consistono in un'alterazione della porzione craniale della notocorda embrionale producendo una duplicazione più o meno grave ed estesa della faccia. Scopo del presente lavoro è quello di descrivere i quadri anatomico-patologici e radiografici di un caso di diprosopia in un vitello occasionalmente occorso alla nostra osservazione. Esternamente, il vitello presentava due teste divergenti tra loro disegnando una forma di V aperta ad ampia angolatura e provviste, ciascuna, di propri apparati oculo-palpebrali, orecchie e distinte regioni nasali con i relativi muselli. L'esame radiologico, effettuato prima della necropsopia, evidenziava la completa individualità delle due teste che si articolavano su un singolo rachide attraverso due atlanti, fusi tra essi, su di un unico epistrofeo malformato; si apprezzava, inoltre, un ampio spazio faringeo sfociante in una singola trachea, di diametro apparentemente maggiore rispetto ad un soggetto normale. L'esame interno confermava quanto precedentemente osservato radiologicamente. Ad un esame più particolareggiato si apprezzava, per ciascuna testa, singoli apparati linguali, un naso-faringe e una oro-faringe normale con distinte epiglottidi ed un ampio canale esofageo prossimale; l'esame interno dei due crani rivelava la presenza di singoli encefali e cervelletti, con duplicazione del midollo allungato.

Pur rientrando nella tradizionale classificazione "*Diprosopus tetraophthalmus*", le particolarità morfologiche riscontrate sembrano non concordare con le più note descrizioni del difetto. Infatti, la pressoché completa formazione di due teste, con i rispettivi sistemi nervosi centrali, e la fusione caudale del midollo allungato indicherebbero l'origine del difetto verosimilmente nelle regioni più caudali della notocorda embrionale.

Parole chiave: Anomalie congenite, Diprosopia, radiologia, vitello

DIPROSOPUS TETRAOPHTALMUS IN A CALF: GROSS AND RADIOLOGICAL FINDINGS

Diprosopies are alterations arising in the cranial embryonic notochord and resulting in facial duplications of different degree and severity. Aim of this paper is to describe the morphological and radiological features of a case of diprosopy occasionally found in a calf. Externally, the calf showed the presence of two head caudally jointed in a large angled V shape. Each head had own oculo-palpebral apparatuses, ears and nostril. Radiological examination, performed prior the dissection, showed two complete heads jointed on a single vertebral column through two fused atlas and a single malformed axis; furthermore, a large pharyngeal space was detected. Internal examination confirmed the previous radiological findings; moreover, each head possessed a normal tongue, a nasopharynx, an oropharynx and a single epiglottis, merging in a wide oesophageal space. After opening, the two skulls revealed the presence of single brains and cerebella and two medulla oblongata. The malformed calf was classified as "*Diprosopus tetraophthalmus*", even if the morphological findings, consisting in two complete heads with own CNS and the caudal fusion of the medulla oblongata, suggest a different origin of the defect.

Key words: Congenital defects, Diprosopiasis, Radiology, Calf

DERADELPHOUS CEPHALOTHORACOPAGUS (OCTOPUS BIAURITUS) IN DUE GATTINI: ASPETTI ANATOMO-PATOLOGICI E RADIOLOGICI

Mazzullo Giuseppe¹, Imburgia Vito², Bergamaschi Elisabetta², Luzzo Alfieri Carmelo², Macri Francesco¹

¹*Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria, Sezione di Patologia Generale e Anatomia Patologica, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Messina.* ²*Liberi Professionisti, Ospedale Veterinario "S. Chiara", Brescia*

La Cefalotoracopagia è una forma di mostruosità doppia raramente riportata in medicina veterinaria. Scopo del presente lavoro è quello di descrivere i quadri patologici e radiologici della malformazione occasionalmente riscontrata in due gattini. All'esame macroscopico, i due soggetti presentavano una fusione pressoché "frontale" dei due corpi, un'unica grande testa, unico ampio torace, singolo addome, quattro arti anteriori, due pelvi, quattro arti posteriori, due cordoni ombelicali, due code. L'esame radiologico rilevava un unico cranio malformato, risultante dalla fusione laterale dei due emicrani non perfettamente allineati, il tutto sottolineato dalla presenza di una linea radio-trasparente medialmente alla volta cranica, e due colonne vertebrali di aspetto scoliotico che si articolavano a livello occipitale con un atlante non perfettamente sviluppato e ruotati di 90° rispetto al cranio a livello della seconda vertebra cervicale.

L'esame interno, effettuato mediante unica apertura della cavità toraco-addominale, rivelava la presenza di un singolo cuore ed un singolo fegato megalici; l'apparato gastro-enterico era costituito da due lingue congiunte ad un singolo apparato ioideo ed un unico tratto digerente sino alla regione ileo-cieco-colica, dove l'intestino si biforcava in due colon ben distinti e terminanti in due distinte regioni anali, disegnando una figura a Y; inoltre, si evidenziava fusione tracheale, polmoni parzialmente fusi e reni duplicati.

Gli autori discutono i meccanismi patogenetici di questa condizione, infrequentemente riportata nella pratica veterinaria.

Parole chiave: Anomalie congenite, gemelli congiunti cefalotoracopago, gatto

DERADELPHOUS CEPHALOTHORACOPAGUS (OCTOPUS BIAURITUS) IN TWO KITTEN: GROSS AND RADIOLOGICAL OBSERVATIONS

Cephalothoracopagus is a form of conjoined twinning rarely reported in veterinary literature. Aim of this paper is to describe the gross and radiological features observed in a case of cephalothoracopagus in two kittens. The twins had two nearly opposite fused bodies, with one larger than normal head. Thorax and abdomen appeared to be unique, more extensive than normal puppies and with two umbilical cords arising from a single navel. There were two sets of forelimbs abnormally spatial oriented. The two pelvises were distinct and separated by its own hind limbs and one tail each. Radiological features revealed: a single skull, resulting by the lateral fusion of two different emi-skulls at the medial occipital area as indicated by the presence of radiotransparent medial line on the cranial vault and the presence of two vertebral spines, jointed to incompletely developed atlas bones, and turned at 90° as compared to the head and to the second cervical vertebra. Internal examination, performed by a single opening of abdominal and thoracic cavities, revealed the presence of single but enlarged liver and heart, the gastro-intestinal apparatus showed two tongues joined to a single hyoid bone. A single oesophagus inserted into a single stomach and the intestine appeared unique until the ileo-coecal region, where two colons merged, each ending in its own anal region, producing a Y-shaped figure, fusion of the two tracheas, partially duplicated lungs and duplication of kidneys. Authors discuss the pathogenic mechanisms of this condition, infrequently reported in veterinary practice.

Key words: Congenital defects, Conjoined Twins, Cephalothoracopagus, cat

DUE CASI DI TIMOFIBROLIPOMA NEL CANE

Morini Maria⁽¹⁾, Bettini Giuliano⁽¹⁾, Casadio Tozzi Andrea^(*), Mandrioli Luciana⁽¹⁾, Spadari Alessandro⁽²⁾, Diana Alessia⁽²⁾, Scarpa Filippo⁽¹⁾, Romagnoli Noemi⁽²⁾

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna; Facoltà di Medicina Veterinaria. ⁽¹⁾Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale. ⁽²⁾Dipartimento Clinico Veterinario. ^()Libero professionista, Toscanella di Dozza, Bologna*

Il timolipoma è una rara patologia tumorale benigna del mediastino anteriore che nell'uomo rappresenta meno del 10% di tutte le neoplasie del timo, caratterizzata dalla compresenza di tessuto adiposo maturo e tessuto timico. Quando, associate a queste due componenti, si ritrovano anche estese aree di tessuto fibroconnettivale maturo, la neoplasia viene diagnosticata come una variante istologica del timolipoma, e chiamata "timofibrolipoma".

In patologia veterinaria esiste una singola segnalazione di timolipoma nel gatto, mentre la variante istologica del timofibrolipoma non è mai stata descritta.

Vengono presentati due casi di neoplasie mediastiniche osservate in un cane Pitbull femmina di 8 anni e in un cane meticcio di grossa taglia maschio di 9 anni, in cui l'esame istologico ha fornito evidenze coerenti con la diagnosi di timofibrolipoma. In entrambi i casi si trattava di voluminose neoformazioni localizzate nel mediastino anteriore (rispettivamente 9 e 20 cm), che all'esame istologico sono risultate prevalentemente costituite da tessuto fibroso maturo organizzato in strutture pseudolobulari, nel cui contesto erano apprezzabili tralci cordoniformi di cellule epiteliali ed aggregati di cellule linfoidi. Erano inoltre presenti aree di tessuto adiposo maturo e, nel secondo caso, ampie aree di necrosi e di emorragia.

La tipizzazione immunoistochimica ha escluso possibili origini extratimiche delle neoplasie, quali tiroide, polmone, chemocettori aortici (negatività ai markers TTF-1, CK19, cromogranina, sinaptofisina) e ha confermato la compresenza di componenti tissutali di diversa origine embriologica (CKAE1/AE3, CK5/6, CK14, CD3, CD79, CD45RA, vimentina, actina) avvalorando l'ipotesi di una possibile origine amartomatosa del processo.

Parole chiave: timofibrolipoma, timo, mediastino, cane

INTRODUZIONE

Il timolipoma è una rara patologia tumorale benigna del mediastino anteriore che nell'uomo rappresenta il 2-9% di tutte le neoplasie del timo, caratterizzata dalla compresenza di tessuto adiposo maturo e tessuto timico (1). Quando, associate a queste due componenti, si ritrovano anche estese aree di tessuto fibroconnettivale maturo, la neoplasia viene diagnosticata come una variante istologica del timolipoma, e chiamata "timofibroliipoma" (1,2). All'esame istologico i timofibroliipomi sono prevalentemente costituiti da tessuto fibroso maturo organizzato in strutture pseudolobulari, nel cui contesto sono apprezzabili tralci cordoniformi di cellule epiteliali ed aggregati di cellule linfoidi (2).

In patologia veterinaria esiste una segnalazione di timolipoma nel gatto (3) ed una recentissima nel cane (4), mentre la variante istologica del timofibroliipoma non è mai stata descritta.

Vengono qui presentati due casi di neoplasie mediastiniche nel cane in cui l'esame istologico ha fornito evidenze coerenti con la diagnosi di timofibroliipoma.

Caso 1. Cane Pitbull, femmina, di 8 anni, che alla visita clinica si presentava depresso, con dispnea, polso piccolo e frequente e mucose congeste. All'auscultazione del torace i toni cardiaci risultavano distanti e molto attutiti, e la percussione del torace permetteva di apprezzare un'ottusità che si annullava con il posizionamento verticale del soggetto. L'esame radiografico del torace metteva in evidenza la presenza di una opacità tissutale diffusa alle zone sovrasternali e sottovertebrali associata ad una mancata visualizzazione della silhouette cardiaca e ad uno spostamento dorsale della trachea. Tali reperti radiografici erano compatibili con un versamento pleurico bilaterale di grado grave. Sottoposto a toracosopia esplorativa con approccio dal fianco destro, in cui si evidenziava versamento siero emorragico associato alla presenza di una massa a carico del mediastino craniale, il soggetto è stato soppresso alcuni giorni dopo l'intervento per aggravamento della sintomatologia. In sede necroscopica si osservava in mediastino anteriore una neoformazione ovoidale lobulata, apparentemente capsulata, di colore grigio-rossastro, con asse maggiore di 9 cm (fig. 1a, 1b). Campioni dalla massa sono stati processati per l'istologia e colorati con ematossilina-eosina per l'immunoistochimica (tabella 1). All'osservazione

istologica a piccolo ingrandimento, la neoformazione appariva strutturata in pseudolobulazioni costituite prevalentemente da tessuto fibroconnettivale (circa il 70% del campione analizzato), e in minor percentuale da tessuto linfoepiteliale simile a timo (circa il 20%) e da sparse isole di tessuto adiposo (10%). A più forte ingrandimento, il tessuto timico consisteva in ammassi multifocali composti da cellule epiteliali di piccole dimensioni, di forma cuboidale e con elevato rapporto N:C, strutturati in piccoli nidi oppure in assetto simil-tubulare, circondati da numerosi linfociti privi di organizzazione corticomidollare o centri germinativi; occasionalmente erano inoltre apprezzabili formazioni epiteliali concentriche riferibili a corpuscoli di Hassal. Le isole di tessuto timico erano connesse fra loro da sottili sepimenti simil-cordoniformi composti da cellule epiteliali e sparsi linfociti. Il tessuto fibroconnettivale frammisto al tessuto timico e che costituiva la maggior parte della neoformazione era strutturato in pseudolobuli formati da spessi fasci di tessuto connettivo maturo ad andamento variabile, talvolta organizzato in figurazioni concentriche. Erano inoltre presenti, frammiste al tessuto fibroconnettivale, piccole aree di tessuto adiposo maturo (fig. 1c, 1d). Non si osservavano aree di necrosi di emorragia, o presenza di atipie cellulari in alcune delle componenti cellulari. Le colorazioni immunoistochimiche effettuate confermavano la compresenza di una componente epiteliale (positività a CKAE1/AE3, CK 5/6 e CK19) e di una componente linfoide (CD3 e CD79) caratteristica del tessuto timico.

Caso 2. Cane Meticcio, maschio, di 9 anni, portato alla visita clinica per accertamenti radiologici a seguito di un evento traumatico al torace. L'esame radiografico del torace metteva in evidenza un'area di forma irregolarmente rotondeggiante, a margini netti e radiopacità tissutale del diametro maggiore di 20 cm circa occupante l'intero emitorace sinistro (fig. 3a). L'esame ecografico del torace evidenziava una massa a margini netti con caratteristiche ecostrutturali disomogenee a carico del mediastino craniale. Tale massa determinava uno shift mediastinico destro della silhouette cardiaca. Sottoposto a toracotomia sagittale con asportazione della massa, il soggetto era successivamente deceduto per arresto cardiaco. La neoformazione asportata si presentava

apparentemente capsulata, di forma ovoidale, di colore grigio-rossastro, con asse maggiore di 25 cm (fig. 3b); in sezione si osservavano ampie aree emorragico-necrotiche. Campioni dalla massa sono stati processati per l'istologia e colorati con ematossilina-eosina, e su sezioni seriali degli stessi sono state effettuate colorazioni immunohistochemiche, i cui risultati sono riportati in tabella 2.

All'osservazione istologica a piccolo ingrandimento buona parte della massa era costituita da tessuto necrotico-emorragico. La restante porzione era composta prevalentemente da tessuto fibroconnettivale (80%) e da tessuto timico (20%), con rarissime aree di tessuto adiposo maturo. A più forte ingrandimento, la componente timica era organizzata in isole composte da cellule epiteliali poligonali, con nuclei ovoidali ed evidenti nucleoli, talora con moderate atipie cellulari, e circondata da cellule linfoidi non strutturate in centri germinativi o organizzazione corticomidollare. Isole di tessuto timico erano unite fra loro da sottili sepimenti simil-cordoniformi composti da cellule epiteliali ed, in misura minore, da linfociti. La restante parte della neoformazione era composta da tessuto fibroconnettivale maturo colorato in azzurro intenso con la colorazione tricromica di Masson, che circondava il tessuto timico ed era strutturata in pseudolobuli (fig. 3c e 3d). Colorazioni immunohistochemiche effettuate sugli stessi preparati confermavano anche in questo caso la compresenza di una componente epiteliale (positività a CKAE1/AE3, CK 5/6, CK14 e CK19) e di una componente linfoide (CD3 e CD79) caratteristica del tessuto timico.

DISCUSSIONE

Nel cane, a carico del timo, oltre a timomi e linfomi timici esistono sporadiche segnalazioni di iperplasie timiche e di cisti branchiali (5); molto recentemente (maggio 2008) è stato descritto un

caso di timolipoma (4), mentre il timofibrolipoma non è mai stato segnalato. In entrambi i nostri casi la tipizzazione immunohistochemica ha escluso possibili origini extratimiche (quali tiroide, polmone, chemocettori aortici) e ha evidenziato la compresenza di componenti tessutali di diversa origine e comunque coerenti con l'origine timica. Nel primo caso era anche presente una cospicua quantità di tessuto adiposo e numerosi corpuscoli di Hassal, mentre nel secondo erano presenti ampie aree necrotiche. L'assenza di atipie nella componente epiteliale e le caratteristiche morfologiche e immunofenotipiche della componente linfoide, congiuntamente alla abbondantissima presenza di tessuto fibroso, hanno permesso di escludere le diagnosi di linfoma, timoma e iperplasia timica, e avvalorato la diagnosi di timofibrolipoma. Nella diagnosi differenziale delle masse mediastiniche del cane devono pertanto essere considerati anche timolipoma e timofibrolipoma, neoplasie istologicamente benigne che possono tuttavia raggiungere notevoli dimensioni e determinare importanti compressioni a carico degli organi circostanti.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Silverberg SG: *Surgical Pathology and Cytopathology*. SG Silverberg, RA DeLellis, WJ Frable, eds., third edition, Vol. 2, Churchill Livingstone, 2001.
- 2) Moran CA, Zeren H, Koss MN (1994): Thymofibrolipoma. A histologic variant of thymolipoma. *Arch Pathol Lab Med* 118: 281-2.
- 3) Vilafranca M, Font A (2005): Thymolipoma in a cat. *JFMS* 7: 125-7.
- 4) Ramirez GA, Spattini G et al. (2008): Clinical and histopathological features of a thymolipoma in a dog. *J Vet Diagn Invest* 20: 360-4.
- 5) Jubb, Kennedy and Palmer's *Pathology of Domestic Animals*. MG Maxie, ed., fifth edition, Vol. 3, Elsevier Saunders, 2007.

| Anticorpo primario | Componente epiteliale | Componente linfoide | Componente stromale |
|--------------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|
| CKAE1/AE3 | + | - | - |
| CK5/6 | + | - | - |
| CK14 | - | - | - |
| CK19 | + | - | - |
| Vimentina | - | + | + |
| CD 3 | - | + | - |
| CD79 | - | + | - |
| Cromogranina A | - | - | - |
| Sinaptofisina | - | - | - |
| TTF-1 | - | - | - |
| Ki67 (MIB1 index) | < 1% | < 1% | < 1% |

Tabella 1. Reattività immunoistochimica nel caso 1

| Anticorpo primario | Componente epiteliale | Componente linfoide | Componente stromale |
|--------------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|
| CKAE1/AE3 | + | - | - |
| CK5/6 | + | - | - |
| CK14 | + | - | - |
| CK19 | + | - | - |
| Vimentina | - | + | + |
| CD 3 | - | + | - |
| CD79 | - | + | - |
| Cromogranina A | - | - | - |
| Sinaptofisina | - | - | - |
| TTF-1 | - | - | - |
| Ki67 (MIB1 index) | < 1% | < 5% | < 1% |

Tabella 2. Reattività immunoistochimica nel caso 2

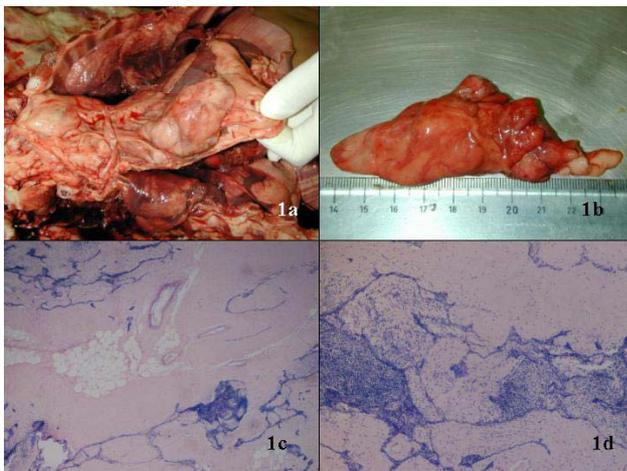


Figura 1. Caso 1. a, b: aspetto macroscopico della massa mediastinica. c, d: quadro istologico corrispondente (EE, 4x e 10x rispettivamente).

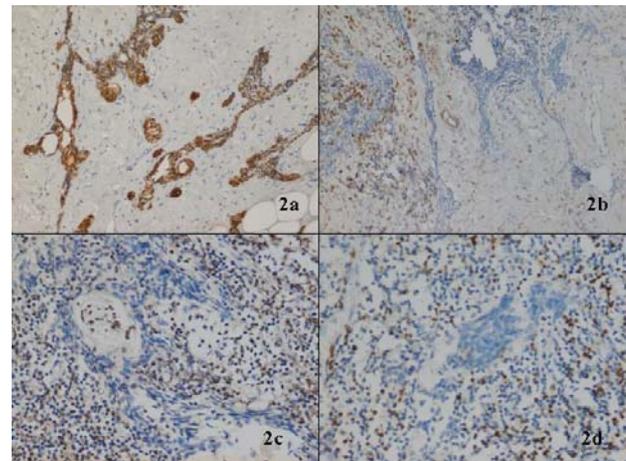


Figura 2. Caso 1, immunoistochimica. a: immunopositività delle cellule epiteliali alla CK19 (20x); b: immunopositività della componente mesenchimale alla vimentina (10x); c, d: immunopositività dei linfociti rispettivamente a CD3 e CD79 (40x).

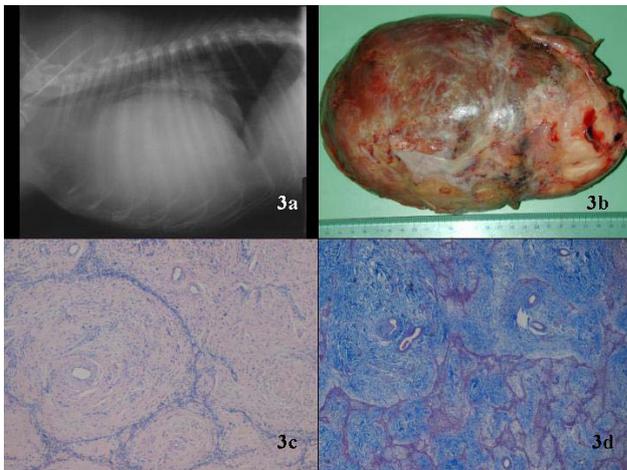


Figura 3. Caso 2. a: quadro radiografico del torace. b: aspetto macroscopico della massa mediastinica. c, d: quadro istologico corrispondente. (EE, 10x; Tricromica di Masson, 4x rispettivamente).

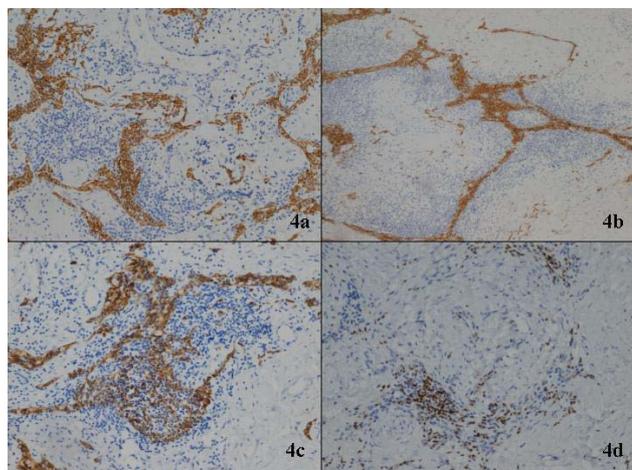


Figura 4. Caso 2, immunoistochimica. a, b, c: immunopositività delle cellule epiteliali rispettivamente a CKAE1/AE3 (20x), CK5/6 (10x), CK19 (20x). d: immunopositività dei linfociti a CD79 (20x).

THYMOFIBROLIPOMA IN TWO DOGS

Thymolipomas are unusual benign neoplasms composed of mature adipose and thymic tissue, representing less than 10% of all thymic tumours in man. When these two components are admixed with abundant fibroconnective tissue, the histological variant thymofibrolipoma is diagnosed. In veterinary pathology there is a unique case report of a thymolipoma in a cat, while thymofibrolipoma has never been described.

We hereby present two cases of mediastinal masses in a 8-year-old female Pit-bull and in a 9-year-old male crossbreed dog, in which histology prompted features of the human thymofibrolipoma. In both cases there were large masses (9 and 20 cm, respectively) in the cranial mediastinum. Histology showed extensive areas of pseudolobulated collagenous tissue, interspersed with thin strands of epithelial cells and lymphoid aggregates. Areas of fat tissue were present within the connective tissue, and necrosis and hemorrhage were prominent in the second case. Immunohistochemistry excluded any extra-thymic origin, as thyroid, lung, and aortic chemoreceptors (negativity to TTF-1, CK19, chromogranin, synaptophysin), and confirmed the coexistence of divergent tissues (CKAE1/AE3, CK5/6, CK14, CD3, CD79, CD45RA, vimentin, actin), thereby supporting a possible hamartomatous origin.

Key words: thymofibrolipoma, thymus, mediastinum, dog

DESCRIZIONE DI UN CASO DI ERMAFRODITISMO NEL CANE

**Puleio Roberto¹, Mancuso Rosario², Napoli Rosario³, Nocera Giuseppe², Mira Lucrezia¹,
Monteverde Vincenzo¹**

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia¹, Veterinario libero professionista², Veterinario
ASL³*

Gli autori descrivono un caso di sospetto ermafroditismo in una cagna di due anni, meticcio, ricoverata per la sterilizzazione presso l'ambulatorio comunale del canile di Agrigento nel corso della campagna annuale per la prevenzione del randagismo. A seguito della castrazione chirurgica, effettuata nel dicembre del 2007, venivano inviate al laboratorio di Istopatologia dell'IZS della Sicilia, entrambe le ovaie, per accertamenti nei confronti di un possibile episodio di ermafroditismo. Il sospetto scaturiva dal fatto che il soggetto presentava, all'esame del vestibolo vaginale, un clitoride particolarmente sviluppato (circa 1 cm.), che alla palpazione evidenziava una consistenza ossea. All'apertura delle cavità addominale, l'apparato genitale nel suo insieme non mostrava alterazioni macroscopicamente apprezzabili. Comunque si procedeva all'esame istopatologico delle ovaie che venivano fissate in formalina tamponata al 10%, incluse in paraffina e ridotte in sezioni al microtomo dello spessore di 3-4 micron per la colorazione con Ematossilina-Eosina. L'osservazione dei preparati al microscopico ottico mostrava in entrambi gli organi la presenza sia di tessuto ovarico che testicolare. Il tessuto evidenziava numerosi follicoli a diverso grado di maturazione, frammisti a qualche follicolo ovarico cistico. Il parenchima testicolare era rappresentato significativamente da tubuli seminiferi privi di spermatozoi con caratteri di atrofia. La diagnosi istopatologica ha quindi confermato il sospetto clinico di ermafroditismo "vero" ed nello specifico un "ovotestis" per la contemporanea presenza di tessuto gonadico maschile e femminile in entrambe le ovaie. Il cariotipo presente in questi casi è caratterizzato dai cromosomi XX/XY o XX/XXY e può essere originato dalla fusione di due zigoti con cromosomi sessuali differenti e con formazione finale di una chimera. La letteratura riporta come i soggetti aventi questo cariotipo siano, come in questo caso, fenotipicamente delle femmine, con un clitoride particolarmente sviluppato (1,2). Inoltre la recente e completa mappatura del DNA canino (Guyon,2003) ha permesso di evidenziare un gene (Sry) responsabile della differenziazione sessuale; in quanto Sry (Sex Determining Region Y) è responsabile della formazione del tessuto testicolare ed è normalmente presente sul cromosoma Y. Nel caso di un ermafroditismo si rileva un cariotipo XX Sry positivo, per traslocazione del gene Sry sul cromosoma X; nel caso invece di un ovotestis con cariotipo XX Sry negativo è sconosciuto il gene responsabile della formazione del tessuto testicolare (5). Il nostro caso può derivare da entrambe le possibilità.

Parole chiave: ermafroditismo, ovotestis, intersesso, cane

INTRODUZIONE

L'Ermafroditismo vero è una rara malformazione caratterizzata dalla contemporanea presenza nello stesso individuo di tessuto gonadico maschile e femminile. Nel cane le diverse modalità di associazione dei due tessuti permettono di distinguerne tre tipi:

- 1) Ermafroditismo bilaterale: quando entrambe le gonadi sono costituite da tessuto ovarico che testicolare (ovotestis).
- 2) Ermafroditismo unilaterale: quando un ovotestis è associato contralateralmente con una gonade maschile o femminile.
- 3) Ermafroditismo laterale o alternante: quando ci sono una gonade femminile da un lato ed una maschile dall'altro (Marcato 2001).

MATERIALI E METODI

Nel Dicembre 2007 veniva inviato presso questo laboratorio (Diagnostica Specialistica, Laboratorio Istopatologia, IZS Sicilia A. Mirri) un campione di ovaie per un sospetto caso di ermafroditismo. La cagna era stata sterilizzata presso l'ambulatorio comunale del canile di Agrigento nel corso di una campagna di sterilizzazione dei cani randagi, in quanto priva di proprietari. Il sospetto nasceva dal fatto che la cagna in apparenza femmina, mostrava alla dilatazione del vestibolo vaginale un clitoride particolarmente sviluppato (circa 1 cm), che alla palpazione evidenziava una struttura ossea. All'esame anatomico-patologico delle ovaie inviate si sospettava la contemporanea presenza delle gonadi maschili e femminili. L'esame istopatologico delle ovaie conservate in formalina tamponata al 10%, veniva eseguito, come di routine, dopo processazione, inclusione in paraffina e sezione con microtomo di fettine dallo spessore di 4-5 micron.

RISULTATI E DISCUSSIONE

L'esame microscopico delle ovaie mostrava in entrambe sia tessuto ovarico, che testicolare. Le diverse sezioni evidenziavano numerosi follicoli a diverso grado di maturazione, frammenti a qualche follicolo ovarico cistico; era inoltre presente parenchima testicolare con tubuli seminiferi privi di spermatozoi nel loro lume. Il tessuto testicolare aveva caratteri di atrofia. Ciascun ovaio aveva un plesso pampiniforme, fimbrie e una tuba uterina. La diagnosi istopatologica confermava il sospetto

clinico di ermafroditismo vero ed in specifico un ovotestis per la contemporanea presenza di tessuto gonadico maschile e femminile in entrambe le ovaie.

In Letteratura è riportato che la presenza di ormoni maschili (Testosterone) durante la differenziazione embrionale può determinare la comparsa di anomalie a carico dell'apparato genitale femminile (2). Nel nostro caso, pur non potendo escludere con certezza questa possibilità, si ritiene che tale eventualità sia altamente improbabile in quanto la cagna sterilizzata, era un randagio e quindi difficilmente avrebbe potuto accedere a tali farmaci durante la gravidanza.

Si ritiene, quindi, di trovarsi di fronte ad un vero caso di ermafroditismo. Il cariotipo in questi casi è XX/XY o XX/XXY e può essere dovuto alla fusione di due zigoti con cromosomi sessuali differenti con formazione finale di una chimera. Il mosaicismo risultante, dovuto alle due diverse popolazioni cellulari, può anche essere dovuto ad errori nella fase meiotica della divisione cellulare (3). La letteratura riporta come i soggetti aventi questo cariotipo siano fenotipicamente delle femmine con un clitoride particolarmente evidente (1,2), come nel nostro caso. Inoltre la recente e completa mappatura del DNA canino (2003 Guyon) ha permesso di evidenziare un gene (Sry) responsabile della differenziazione sessuale; in quanto Sry (sex determining region Y) è responsabile della formazione del tessuto testicolare, è normalmente presente sul cromosoma Y. Quindi in condizioni fisiologiche il cariotipo di una femmina è XX Sry negativo, mentre un maschio è XY Sry positivo. Nel caso di un Ermafroditismo si rileva un cariotipo XX Sry positivo, per traslocazione del gene Sry sul cromosoma X; nel caso invece di un ovotestis con cariotipo XX Sry negativo è sconosciuto il gene responsabile della formazione del tessuto testicolare (5).

BIBLIOGRAFIA

- 1) J. Vet. Sci. A hermaphrodite dog with bilateral ovotestes and pyometra, Kim KS, Kim O.; 2006 Mar;7(1):87-8.
- 2) Reprod. Domest. Anim. True hermaphroditism in six female littermates after administration of synthetic androgens to a pregnant bitch. De Rooster H, Vercauteren G, Görtz K, Saunders J, Polis. I. Rijsselaere. Anim. 2006 Feb 41(1):22-6.

3) Theriogenology. Disorders of sexual development in the dog and cat. Lyle SK.T. 2007 Aug;68(3):338-43.

4) J. Am. Vet. Med. Assoc. XX true hermaphroditism in a dog. Sommer MM, Meyers-Wallen VN. 1991 Feb 1;198(3):435-8.

5) Theriogenology Genetics, genomics, and molecular biology of sex determination in small animals. Meyers-Wallen VN. 2006 Oct; 66(6-7):1655-8.

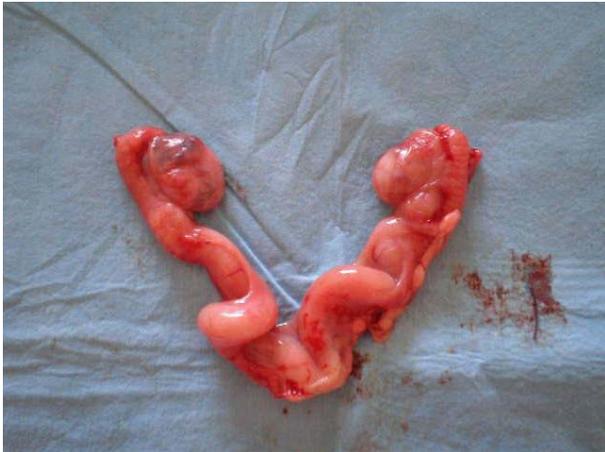


Fig. 1



Fig. 2

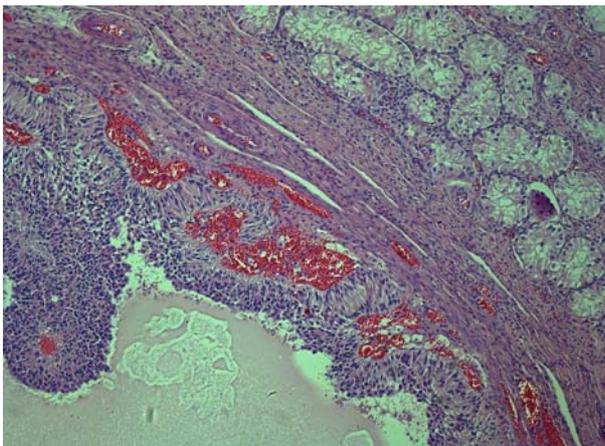


Fig. 3

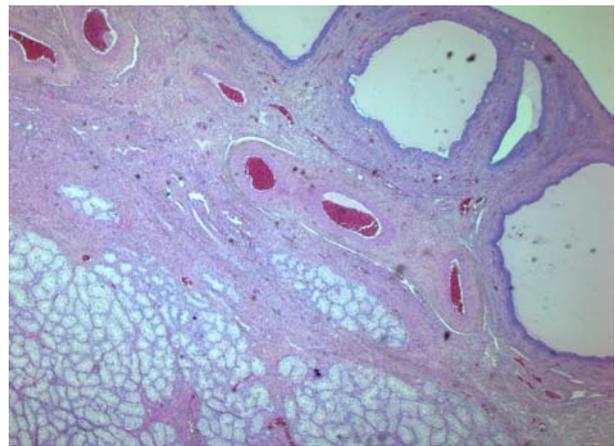


Fig. 4

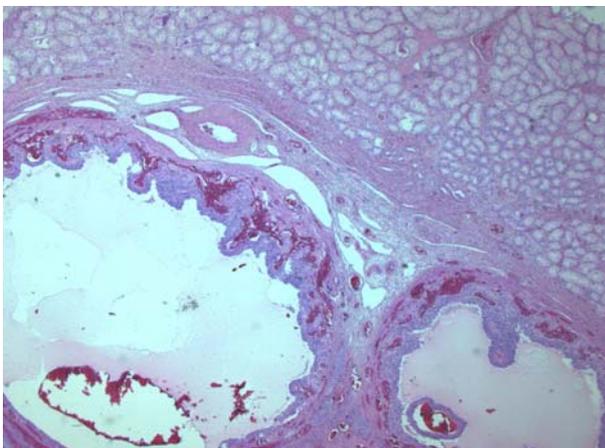


Fig. 5

HERMAPHRODITISM IN A DOG: CASE REPORT

An Hermaphrodite was identified in a two years old stray dog, characterised by an enlarged clitoris that was shown as reddish finger-like structure protruding from the vulva. The gonads were situated caudal to the kidneys and were mainly constituted by seminiferous tubules and interstitial cells and surprisingly they showed ovarian follicles in the cortices. Gross and histopathological findings of the dog suggested a typical case of hermaphroditism with bilateral ovotestis.

Key words: hermaphroditism, dog, ovotestis

LA PROTEINA DI FASE ACUTA ALFA-1-GLICOPROTEINA ACIDA È CONTENUTA NEI GRANULI DEI NEUTROFILI BOVINI E VIENE RILASCIATA A SEGUITO DI ATTIVAZIONE PRO-INFIAMMATORIA

Rahman Mizanur Md¹, Miranda-Ribera Alba¹, Lecchi Cristina¹, Bronzo Valerio¹, Sartorelli Paola¹, Franciosi Federica², Cecilian Fabrizio¹

¹Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Università degli Studi di Milano. ²Dipartimento di scienze animali, Università degli Studi di Milano.

I neutrofili polimorfonucleati (PMN) rappresentano la prima linea di difesa contro i batteri, grazie alla loro capacità di fagocitosi e di *killing*. I PMN sono caratterizzati dalla presenza nel citoplasma di granuli, che, in seguito ad attivazione, rilasciano nell'ambiente circostante una serie di proteine, tra cui la alfa-1-glicoproteina acida (AGP). È stato recentemente riportato che alcune isoforme della AGP sono prodotte a livello locale durante un processo infiammatorio o possono essere rilasciate dai PMN nel sito infiammatorio; tuttavia l'AGP è prodotta principalmente dal fegato e viene rilasciata nel torrente circolatorio; Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare se i PMN bovini rilasciano AGP in seguito a stimolazione con differenti attivatori e se la proteina contenuta nei granuli è il prodotto dello stesso gene e il pattern oligosaccaridico è differente dalla isoforma prodotta dal fegato.

La quantificazione della AGP contenuta nei granuli dei PMN è stata effettuata mediante *radial immunodiffusion analysis* (RID) ed è risultata pari a 0.1 µg per 10⁶ cellule. L'esocitosi dei granuli primari e secondari è stata studiata mediante saggi enzimatici specifici, che portano a ritenere che la AGP sia contenuta soprattutto nei granuli secondari. Si è osservata la compresenza di due isoforme di AGP, una ad alto peso molecolare (MW) pari a 50-60kDa, l'altra a basso MW, simile a quella presente nel sangue, pari a 45kDa. Il sequenziamento del gene (cDNA) dell'AGP dei PMN non ha mostrato alcuna differenza rispetto alla sequenza ottenuta dal gene dell'AGP di fegato, presumibilmente quindi le differenze relative al MW delle isoforme proteiche sono dovute a differenti modificazioni post-traduzionali. Lo studio dell'espressione genica mediante Real Time PCR ha mostrato che il gene dell'AGP è fisiologicamente espresso dai PMN bovini e che stimolazione dei PMN con LPS, PMA o ZAS non determina alcuna modificazione dell'espressione del gene.

I risultati del nostro studio hanno evidenziato che (i) i PMN contengono due isoforme di AGP, una delle quali è iperglicosilata rispetto a quella plasmatica; (ii) la AGP è contenuta nei granuli secondari dei PMN ed è rilasciata in seguito a stimolo pro-infiammatorio.

Grazie alla sua attività anti-infiammatoria, la AGP dei PMN potrebbe agire come modulatore dell'azione dei PMN stessi nel sito infiammatorio, riducendo i danni causati da un'eccessiva risposta infiammatoria.

Parole chiave: Esocitosi, PMN bovini, alfa-1 glicoproteina acida, infiammazione

INTRODUZIONE

I granulociti polimorfonucleati (PMN) rappresentano la prima linea di difesa nei confronti delle invasioni batteriche. L'attivazione dei PMN induce il rilascio di molecole che vengono prodotte durante la fase di maturazione delle cellule e conservate nei vari tipi di granuli presenti nei granulociti. La proteina di fase acuta alfa-1-glicoproteina acida (AGP) è una di queste (9).

L'AGP viene prodotta principalmente dal fegato ed è immessa nel torrente circolatorio; è stato tuttavia dimostrato che isoforme della AGP sono prodotte a livello locale durante i processi infiammatori e, almeno nell'uomo, sono trasportate nei tessuti infiammati dai neutrofili.

Si pensa che uno dei ruoli principali dell'AGP sia quello di attivare una risposta a *feedback* negativo, che determina una modulazione locale della attività dei neutrofili. La struttura primaria dell'AGP bovina, come anche il suo pattern di glicosilazione, sono già state descritte (1, 5). Recentemente questo gruppo (4) ha identificato una isoforma ad alto peso molecolare presente nei neutrofili bovini (PMN-AGP), ma tanto la localizzazione dell'AGP nelle cellule, quanto gli stimoli che inducono la sua esocitosi, sono ancora poco chiari. Le domande cui si è cercato di rispondere in questo studio, con la finalità ultima di approfondire le basi molecolari della risposta innata del bovino, sono state:

- L'AGP è presente nei PMN bovini? Se sì, in che quantità?
- L'AGP può essere rilasciata dai neutrofili in seguito a stimoli pro-infiammatori?
- La struttura della AGP presente nei neutrofili è differente da quella della AGP plasmatica?
- I neutrofili attivati esprimono mRNA codificante per l'AGP?

MATERIALI E METODI

I neutrofili sono stati purificati a partire da sangue intero bovino mediante stratificazione su gradiente di Percoll® (1.087g/ml).

Il contenuto cellulare di AGP è stato valutato a partire da 10^8 cellule, centrifugate e risospese in 200µl di *lysis buffer*, contenente 0.5%hexadecyltrimethylammonio bromuro (CTAB) per 30 min. La quantificazione di AGP è stata eseguita in due modi: I) immunodiffusione radiale (RID) (Bovine alfa-1 AGP Plate, Tridelta)

e II) mediante semi-quantificazione densitometrica.

La esocitosi dell'AGP è stata determinata a partire da cellule purificate incubate con forbolo 12-miristato 13-acetato (PMA) (2.5 µg/ml), il siero attivato da Zymosan (ZAS, contenente il C5a) (250 µg/ml) e la ionomicina (2 µM, come controllo positivo) per 0, 15, 30, 60, 120 minuti. La effettiva presenza della AGP nel surnatante della cultura è stata determinata mediante SDS-PAGE e Western Blotting di 15 µl della soluzione.

La degranolazione è stata verificata mediante analisi dell'attività della mieloperossidasi (MPO) per i granuli primari e della fosfatasi alcalina (ALK-P) per i granuli secondari.

Per verificare il cambiamento della distribuzione dei granuli sulla superficie delle cellule dopo attivazione, i neutrofili sono stati attivati con PMA e ZAS per 30 minuti e la distribuzione superficiale della proteina è stata evidenziata mediante immunocitochimica, utilizzando un anticorpo primario anti-AGP bovina (17 µg/ml in DPBS) (3) ed un anticorpo secondario coniugato con (FITC) (1:200).

Aliquote di 1 µg di AGP plasmatica e granulocitaria sono state deglicosilate con 2µl di soluzione di PNGase-F, incubandole per 3 ore a 37°C e, in alcuni casi, fino a 12 ore. I campioni sono stati quindi analizzati mediante SDS-PAGE e Western Blotting.

Per valutare la variazione della quantità di mRNA codificante AGP, l'RNA totale dei neutrofili stimolati con PMA e ZAS per 30' e 120' in presenza di LPS è stato estratto e retrotrascritto. Il cDNA ottenuto è stato usato come template per allestire la Real time PCR insieme a primers specifici disegnati sulla sequenza dell'AGP. L'espressione relativa dell'mRNA è stata valutata rispetto al gene *housekeeping* alfa-actina.

RISULTATI

La quantificazione mediante RID non ha dato alcun risultato apprezzabile. Lo stesso esperimento eseguito su cellule rotte meccanicamente, senza detergente, ha egualmente dato risultati negativi. La figura.1 presenta i risultati della valutazione semiquantitativa della AGP presente nei neutrofili, eseguita confrontando il contenuto totale dei neutrofili con quantità note di AGP plasmatica. La quantità di AGP presente nei neutrofili è all'incirca di 0.1 µg/10⁶ cellule. La figura 1 mostra la presenza di

almeno due proteine: una isoforma ad alto PM (50-60 kDa) e una a basso PM (45 kDa).

Dopo digestione con PNGasi-F della isoforma granulocitaria, il peso molecolare della proteina risulta simile al peso teorico della catena polipeptidica (20.41 kDa). La deglicosilazione della AGP plasmatica invece è parziale: sono infatti presenti sia la forma completamente deglicosilata di 20 kDa sia glicoforme parzialmente deglicosilate a 20, 26 e 32 kDa (Figura. 2).

La presenza dell'AGP nel surnatante delle cellule attivate con PMA e ionomicina è riscontrabile mediante SDS-PAGE e Western Blotting. (Figura 3A) dopo 15 minuti dalla attivazione delle cellule. La attivazione delle cellule induce il rilascio della ALK-P, un marker dell'esocitosi dei granuli secondari, mentre il trattamento con PMA determina una scarsa degranolazione dei granuli primari, evidente dalla ridotta attività enzimatica della MPO (Figura 3B).

La immunoreattività nei confronti della AGP bovina appare aumentata dopo stimolazione con ZAS, infatti si possono osservare aggregati sulla membrane cellulare dei neutrofili (Figura 4B₁).

La Figura 5A dimostra che i neutrofili non attivati presentano mRNA codificante per AGP, l'espressione del quale, in seguito ad attivazione con LPS, PMA e ZAS, non è modulata (Fig. 5b).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Le proteine di fase acuta possono raggiungere il focus infiammatorio mediante l'essudato, tuttavia è stato dimostrato che alcune di loro, come l'AGP, possono essere prodotte localmente, per esempio dalla ghiandola mammaria (4). La concentrazione dell'AGP nel focolaio della infiammazione può venire ulteriormente incrementata da una componente veicolata direttamente dai leucociti. La quantità di AGP identificata all'interno dei neutrofili bovini è simile a quella precedentemente identificata nei neutrofili umani. (7).

I neutrofili attivati con PMA rilasciano contestualmente AGP e ALK-P, un marcatore specifico per i granuli secondari e le vescicole secretorie, ma pochissima MPO, un marcatore per la esocitosi dei granuli primari. Il PMA promuove specificatamente il rilascio delle proteine contenute nei granuli secondari, ma solo in minima parte il rilascio di quelle contenute nei granuli primari (10). E' pertanto possibile ipotizzare che l'AGP bovina sia contenuta nei

granuli primari, come è stato descritto anche nell'uomo (Theilgaard-Monch et al., 2005). Questo studio ha identificato almeno due proteine che vengono riconosciute dall'anticorpo policlonale anti-AGP bovina: una, più abbondante, di 50-60 kDa, e un'altra di 42-45 kDa.

La isoforma a basso peso molecolare è probabilmente la isoforma plasmatica, che viene introdotta mediante pinocitosi insieme al plasma e conservata nelle vescicole (8).

Gli esperimenti di deglicosilazione hanno evidenziato che la isoforma plasmatica e quella leucocitaria hanno un pattern di glicosilazione differente, come risulta dal differente profilo elettroforetico. E' quindi probabile che il diverso peso molecolare sia dovuto ad un differente processamento post-traduzionale, come avviene anche nell'uomo (Theilgaard-Monch et al., 2005). La parziale deglicosilazione della isoforma plasmatica può essere spiegata dal fatto che la PNGasi-F non è in grado di idrolizzare gli oligosaccaridi contenenti il *core* di fucosio legato in posizione alfa (1-3). Si può quindi ipotizzare che alcune glicoforme plasmatiche bovine non possano venire completamente deglicosilate, perché contengono oligosaccaridi che non possono essere idrolizzati dalla PNGasi-F.

La maggior parte delle proteine presenti nei neutrofili vengono solitamente prodotte durante la fase di maturazione midollare delle cellule e conservate nei granuli (6). In questo lavoro è stato però dimostrato che i neutrofili, anche quando non sono attivati, e nonostante la loro breve emivita, possono produrre una seconda ondata di AGP. Questa espressione non sembra essere dipendente dalla attivazione mediante stimoli pro-infiammatori, come LPS, PMA o ZAS.

Esiste una forte correlazione fra il grado di fucosilazione dell'AGP e la sua funzione anti-infiammatoria, dal momento che è stato ipotizzato che le glicoforme iperglicosilate purificate dal plasma durante patologie infiammatorie croniche antagonizzano l'adesione dei neutrofili all'endotelio, competendo per il legame con le E-selectine. (2). Si può pertanto presumere che le glicoforme presenti nei neutrofili, fortemente glicosilate sia nell'uomo (Theilgaard-Monch et al., 2005) sia nel bovino (4), vengono esocitate dai granuli nel sito infiammatorio, dove sono probabilmente coinvolte in processi di attenuazione dei processi difensivi più distruttivi a carico dei tessuti coinvolti. I neutrofili potrebbero quindi rappresentare una importante fonte di AGP

nell'ambiente infiammatorio, che si aggiunge alla componente plasmatica sintetizzata dal fegato.

BIBLIOGRAFIA

- Ceciliani, F., Pocacqua, V., Provasi, E., Comunian, C., Bertolini, A., Bronzo, V., Moroni, P., Sartorelli, P., 2005. Identification of the bovine alpha1-acid glycoprotein in colostrum and milk. *Vet Res* 36(5-6), 735-746.
- Ceciliani, F., Pocacqua, V., 2007a. The acute phase protein alpha1-acid glycoprotein: A model for altered glycosylation during diseases. *Curr. Protein Pept. Sci.* 8(1), 91-108.
- Ceciliani, F., Pocacqua, V., Miranda-Ribera, A., Bronzo, V., Lecchi, C., Sartorelli, P., 2007b. alpha(1)-Acid glycoprotein modulates apoptosis in bovine monocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 116(3-4), 145-152.
- Ceciliani, F., Pocacqua, V., Lecchi, C., Fortin, R., Rebucci, R., Avallone, G., Bronzo, V., Cheli, F., Sartorelli, P., 2007c. Differential expression and secretion of alpha1-acid glycoprotein in bovine milk. *J. Dairy Res.*, 74(3), 374-380.
- Nakano, M., Kakehi, K., Tsai, M., Lee, Y.C., 2004. Detailed structural features of glycan chains derived from alpha1-acid glycoproteins of several different animals: the presence of hypersialylated, O-acetylated sialic acids but not disialyl residues. *Glycobiology* 14(5), 431-441.
- Paape, M.J., Bannerman, D.D., Zhao, X., Lee, J.W., 2003. The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk. *Vet. Res.* 34(5), 597-627.
- Poland, D.C., Garcia Vallejo, J.J., Niessen, H.W., Nijmeyer R., Calafat, J., Hack, C.E., Van het Hof, B., Van Dijk, W., 2005. Activated human PMN synthesize and release a strongly fucosylated glycoform of alpha1-acid glycoprotein, which is transiently deposited in human myocardial infarction. *J. Leukoc. Biol.* 78(2), 453-461.
- Swain, S.D., Siemsen, D.W., Hanson, A.J., Quinn, M.T., 2001. Activation-induced mobilization of secretory vesicles in bovine neutrophils. *Am. J. Vet. Res.* 62(11), 1776-1781.
- Theilgaard-Mönch, K., Jacobsen, L.C., Rasmussen, T., Niemann, C.U., Udby, L., Borup, R., Gharib, M., Arkwright, P.D., Gombart, A.F., Calafat, J., Porse, B.T., Borregaard, N., 2005. Highly glycosylated alpha1-acid glycoprotein is synthesized in myelocytes, stored in secondary granules, and released by activated neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 78(2), 462-470.
- Udby, L., Calafat, J., Sorenson, O.E., Borregaard, N., Kjeldsen, L., 2002. Identification of human cysteine-rich secretory protein-3 (CRISP-3) as a matrix protein in a subset of peroxidase-negative granules of neutrophils and in the granules of eosinophils. *J. Leukoc. Biol.* 72(3), 462-469.

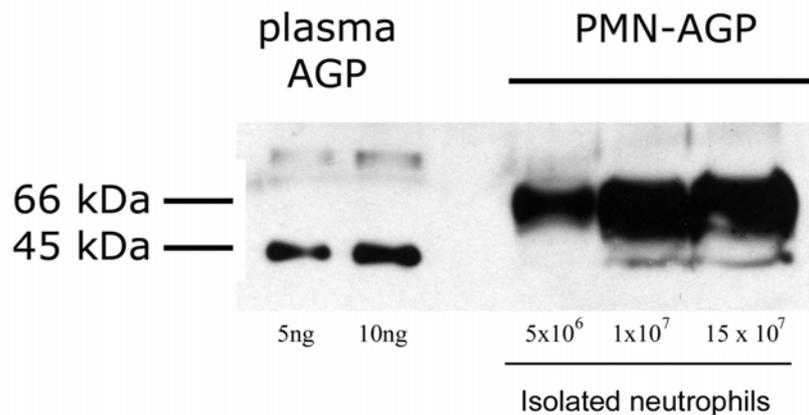


Fig. 1: Analisi semi-quantitativa della AGP presente nei neutrofili bovini. Quantità note di AGP plasmatica bovina sono state caricate su gel e utilizzate come standard. Sullo stesso gel sono state caricati differenti volumi di surnatante proveniente da neutrofili trattati con CTAB. Le proteine sono state semi-quantificate mediante analisi densitometrica.

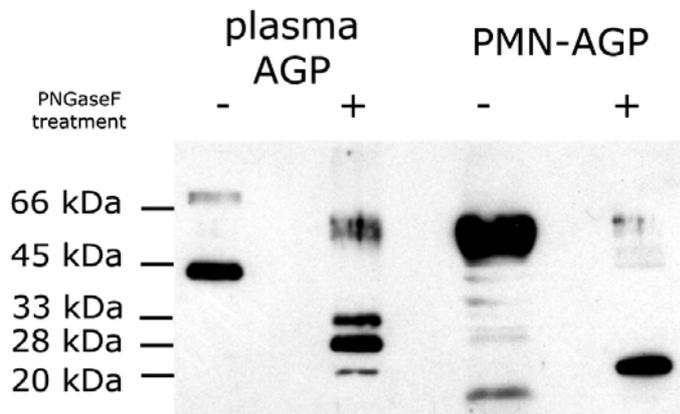


Fig. 2: Deglicosilazione della isoforma plasmatica e granulocitaria di AGP. Le isoforme plasmatiche e granulocitarie di AGP sono state deglicosilate per tre ore con PNGasi F e aliquote di 10 ng sono state analizzate mediante SDS-PAGE e Western Blotting.

Fig. 3: Esocitosi della isoforma granulocitaria della AGP da parte dei neutrofili attivati. A. I neutrofili bovini sono stati attivati con PMA, utilizzando cellule trattate con ionomicina come controllo positivo. Il controllo negativo è costituito da cellule non stimolate. La isoforma plasmatica della AGP è stata utilizzata come controllo di peso molecolare. I surnatanti sono stati analizzati mediante SDS-PAGE e Western Blotting. B. Degranolazione dei granuli primari e secondari dopo stimolazione con PMA. L'attività enzimatica della fosfatasi alcalina (ALK-P) e della mieloperossidasi (MPO) sono state utilizzate come marker di degranolazione per la esocitosi dei granuli secondarie e primari, rispettivamente. I valori (media di 4 animali \pm SEM) vengono espressi come percentuale sulla quantità totale di enzima dopo trattamento dei neutrofili con CTAB. La significatività statistica è stata accettata a $P < 0.01$ (*). Istogrammi neri = controlli negativi. Istogrammi bianchi = attività della MPO. Istogrammi grigi = attività della ALK-P.

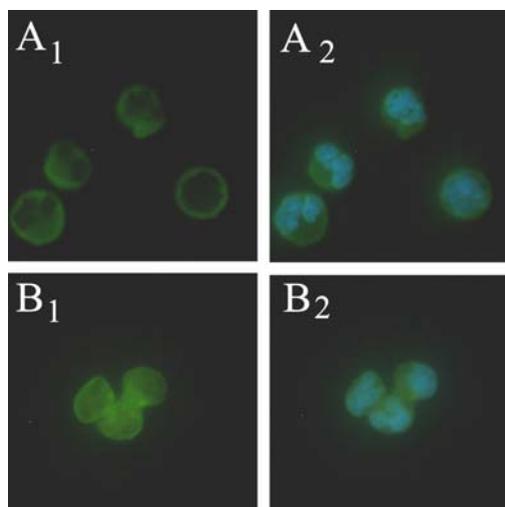
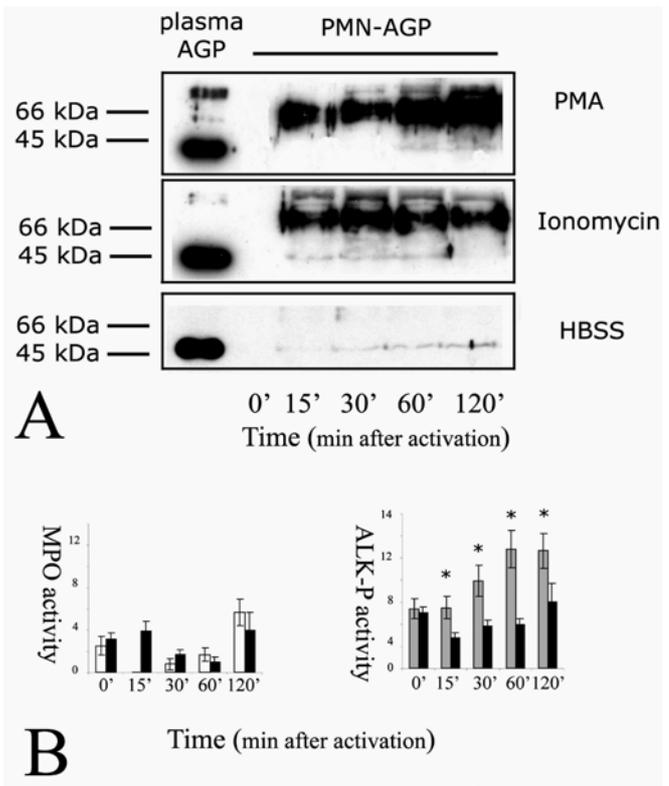


Fig. 4: Traslocazione a livello di membrana citoplasmatica dei granuli contenenti AGP neutrofilica dopo attivazione. I neutrofili bovini sono stati attivati per 30 minuti con ZAS. Pannello A₁: neutrofili non stimolati (controlli negativi) immunocolorati con anticorpo primario anti-AGP bovina (3) e anticorpo secondario anti IgG marcato con FITC (colore verde). Pannello A₂: immagini sovrapposte di anticorpo anti-AGP bovina e colorazione nucleare con DAPI (colore blu). Pannello B₁: neutrofili stimolati con ZAS, immunocolorati con anticorpo primario anti-AGP bovina. Pannello B₂: immagini sovrapposte di anticorpo anti-AGP bovina e colorazione nucleare con DAPI (colore blu) di cellule stimolate con ZAS.

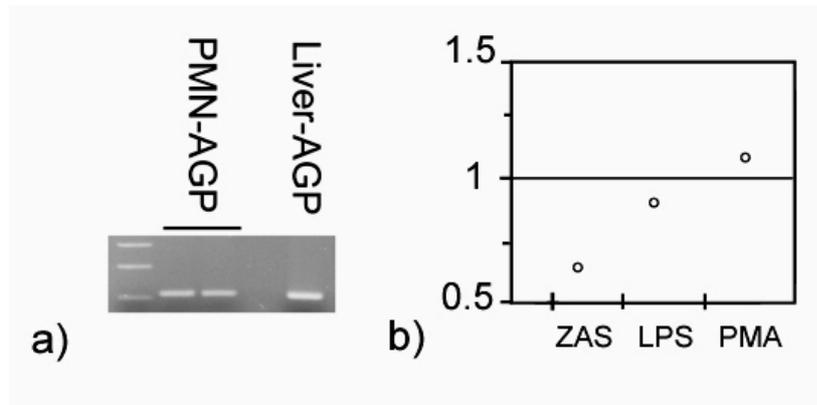


Fig. 5: espressione del mRNA della AGP bovina granulocitaria. a) amplificazione del cDNA della isoforma neutrofilica della AGP bovina (PMN-AGP). L'AGP plasmatica, identificata come 'Liver AGP' è stata utilizzata come standard di peso molecolare e come controllo positivo. b) espressione genica relativa alla AGP neutrofilica dopo incubazione con ZAS, LPS e PMA. I risultati sono stati normalizzati rispetto a cDNA di AGP purificato da cellule non attivate. I valori sono la media di due esperimenti indipendenti.

ALPHA₁-ACID GLYCOPROTEIN IS CONTAINED IN SPECIFIC GRANULES OF BOVINE NEUTROPHILS AND RELEASED AFTER ACTIVATION

Polymorphonuclear neutrophil (PMN) represent the first line of defence against bacterial invasion of host tissue, through their phagocytic and killing activity. PMN activation releases a broad range of compounds that are stored in different granules and alpha-1-acid glycoprotein (AGP) is one of them. Some AGP isoforms can be produced locally during inflammation or carried in the inflamed tissues by defensive cells such as PMN, but AGP is mainly produced by liver and released into blood stream. The aims of this study were to verify not only whether AGP can be exocytosed by bovine PMN after their stimulation with different challengers, but also whether the two isoforms derived from the same gene and compared deglycosylation.

The radial immuno-diffusion (RID) analysis has shown that amount of PMN-AGP is 0.1 µg per 10⁶ cells; the exocytosis of primary and secondary granules was determined by the enzymatic activity of specific markers enzymes: the data suggest that PMN-AGP is contained mainly in secondary granules. Western Blot showed two protein isoforms with high (50-60kDa) and low (45kDa) MW, which is the same of plasma, liver-derived, isoform. The cDNA sequencing revealed that plasma and PMN-AGP proteins are products of the same gene and the differences in MW are due to post translational modification. Real Time PCR revealed that AGP RNA is physiologically expressed by mature resting PMN. Stimulation with LPS, PMA or ZAS didn't modify the mRNA level.

In this investigation it is evidenced that (i) PMN contains two AGP isoforms and one of them is hyperglycosylated glycoform of plasma AGP; (ii) AGP is stored in PMN secondary granules and is released in response to pro-inflammatory stimula. Due to its anti-inflammatory activity, PMN-AGP may work as a fine tuner of the neutrophils functions in the inflammatory focus, by reducing the damages caused by excess of inflammatory response.

Key words: exocytosis, bovine PMN, alpha-1-acid glycoprotein, inflammation

EMANGIOMA EPISCLERALE IN UN GATTO, DESCRIZIONE DEL CASO (DATI PRELIMINARI)

**Ratto Alessandra¹, Monteverde Vincenzo², Crasta Manuela³, Modesto Paola¹,
Tamburello Anna², Loria Guido Ruggero², Ferrari Angelo¹**

¹Centro di Referenza Nazionale per l'Oncologia Veterinaria e Comparata (CEROVEC), Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte Liguria e Valle D'Aosta, Sezione di Genova. ²Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia. ³Veterinario libero professionista, Bologna

Gli Autori descrivono un raro caso di emangioma congiuntivale episclerale, osservato in un gatto adulto, femmina a pelo corto di razza europea, come contributo per lo studio e la classificazione delle neoplasie negli animali domestici. Alla visita clinica il soggetto evidenziava una proliferazione di colorito rosso porpora nell'occhio sinistro. La lesione si estendeva per una lunghezza di circa 12 mm dal canto mediale al canto laterale, lungo il bordo congiuntivale adiacente al limbo, per uno spessore di circa 3 mm. La superficie esterna si presentava irregolare, a grappolo, rugosa e sede di dilatazioni vascolari. L'area perilesionale si presentava modicamente iperemica. Il soggetto veniva sottoposto ad intervento chirurgico e la lesione veniva trattata con due cicli di crioterapia di due minuti ciascuno. La neoformazione, fissata in formalina tamponata al 10%, veniva inviata al laboratorio di istopatologia del CEROVEC, per la diagnosi istologica. Previa riduzione, processazione ed inclusione in paraffina, venivano allestiti i preparati dello spessore di 3 µm e dopo una prima colorazione con Ematossilina Eosina si procedeva all'osservazione al microscopio ottico. L'esame istologico consentiva di osservare una proliferazione benigna non capsulata, costituita da strutture vascolari di varia forma e dimensioni replete di eritrociti e delimitate da un monostrato di cellule endoteliali. Non si evidenziavano né mitosi né atipie cellulari. La lesione è stata diagnosticata come un emangioma congiuntivale. Il follow-up effettuato a distanza di 22 mesi non consentiva di osservare alcuna recidiva. Dalla letteratura in nostro possesso non si sono riscontrati altri casi di emangioma congiuntivale.

Parole chiave: gatto, tumore congiuntivale, emangioma

EPISCLERAL HEMANGIOMA IN A CAT: CASE REPORT (PRELIMINARY INVESTIGATIONS)

A case of episcleral conjunctival haemangioma in an adult domestic short-haired female cat is reported. A red mass on the left eye was observed. The lesion was treated by surgical excision and cryotherapy. Histopathological evaluation showed a solitary and unencapsulated benign tumor. The neoplasm were constituted of variable in size, enlarged, vascular spaces, filled by erythrocytes and surrounded by a single layer of endothelial cells. Mitotic figures were absent. The surgical area recovered in a few days and no recurrence have been reported after 22 months. This is the first case, to our knowledge, of a benign vascular tumor of the conjunctiva in the cat.

Key words: cat, conjunctival tumors, hemangioma

VALIDAZIONE DELLA REATTIVITA' IMMUNOISTOCHEMICA DI UN PANNELLO ANTICORPALE IN DIVERSE SPECIE ITTICHE MEDIANTE L'IMPIEGO DI "TISSUE ARRAYS"

Sirri Rubina, Mandrioli Luciana, Morini Maria, Cesari Alessandro, Bettini Giuliano

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

Ad oggi esistono pochi studi mirati alla caratterizzazione immunofenotipica di componenti cellulari e tissutali nelle specie ittiche, anche a causa della scarsa disponibilità di specifici anticorpi e di informazioni sulla cross-reattività dei markers immunocistochimici (IIC) diretti verso antigeni di mammiferi.

La ricerca ha previsto l'applicazione di un pannello anticorpale in tessuti di diverse specie ittiche al fine di valutare la cross-reattività di anticorpi commerciali usati nel nostro laboratorio, ricorrendo all'allestimento di tissue arrays per ottimizzare tempi di lavorazione e quantità di reagenti impiegati. Sono stati campionati esemplari appartenenti a 12 differenti specie ittiche di interesse commerciale da cui sono stati prelevati cute/muscolo, branchie, fegato/pancreas, rene, milza, gonadi, poi fissati in formalina tamponata al 10% e inclusi in paraffina. Sono stati costruiti arrays per ciascun tessuto dai quali sono state poi tagliate sezioni seriate di 4 µm sottoposte a colorazione IIC.

Sono stati testati anticorpi diretti contro marcatori epiteliali (CKAE1/AE3, CK5/6, CK14, CK19, caderina E), mesenchimali (vimentina, desmina, α -actina-sm, fattore VIII-RA), emopoietici (CD3, CD18, CD45, CD79 α , CD117, MAC387), del tessuto nervoso (proteina S100), endocrini (cromogranina A, sinaptofisina) e antigeni del ciclo cellulare (Ki67, telomerasi-hTERT).

Dei 21 anticorpi testati 7 sono risultati immunoreattivi (CK AE1/AE3, CK5/6, Caderina-E, vimentina, CD117, sinaptofisina e hTERT), con una reattività coerente con quella attesa e omogenea nelle specie testate. La metodica IIC, quando opportunamente validata, può essere pertanto utile per identificare e tipizzare componenti tissutali e cellulari anche negli organismi acquatici.

Parole chiave: immunocistochimica, ittiopatologia, tissue array, cross-reattività

INTRODUZIONE

Ad oggi esistono ancora pochi studi mirati alla caratterizzazione immunofenotipica di componenti cellulari e tissutali nelle specie ittiche. La ragione di questa limitatezza risiede anche nello scarso numero di anticorpi monoclonali che possono essere utilizzati in studi di immunostochimica (IIC) per il riconoscimento di sottopopolazioni cellulari leucocitarie, come trombociti, granulociti neutrofili, linfociti B, cellule NK-like e monociti (Fischer e Koellner, 2007). Per questo motivo da alcuni anni si è sviluppato un filone di ricerca che mira a caratterizzare e valutare, nelle specie ittiche, la cross-reattività di anticorpi (specialmente monoclonali) prodotti da altre specie e utilizzati in medicina umana e su mammiferi. Fischer e Koellner (2007) hanno testato anticorpi monoclonali diretti contro cellule umane della linea linfoide, in timo, pronefro, milza e intestino di trota (*Oncorhynchus mikiss*) e carpa (*Cyprinus carpio*), evidenziando per la prima volta, la cross-reattività del CD14; nonostante questo, la cross-reattività degli anticorpi testati nella maggior parte dei casi, non ha dato esiti positivi, a conferma della notevole distanza filogenetica esistente tra mammiferi e Teleostei.

De Girolamo *et al.* (2000) hanno, invece, dimostrato che l'anticorpo policlonale diretto contro la proteina S100 è in grado di evidenziare una marcata cross-reattività specifica in cellule iuxta-glomerulari distribuite lungo le arterie e arteriole renali afferenti ai glomeruli, confermando la presenza di antigeni S100 in cellule extra-neurali.

Analogamente agli studi condotti sui mammiferi riguardo l'espressione del c-Kit (CD117) nelle cellule neuroendocrine che controllano la motilità gastrointestinale, Rich *et al.* (2007) hanno testato la cross-reattività di questo anticorpo policlonale in Zebrafish (*Danio rerio*) evidenziando la positività di cellule probabilmente riconducibili a cellule di Cajal (ICC).

Infine, Bunton nel 1993 aveva già tentato di verificare la cross-reattività di anticorpi diretti contro le citocheratine in tessuti di specie ittiche per la diagnosi di neoplasie di incerta origine cellulare, evidenziando la capacità delle citocheratine ad ampio spettro (AE1/AE3) di marcare specificamente le cellule epiteliali di cute, branchie, cornea, intestino e timo.

Alla luce di queste informazioni, lo scopo della nostra ricerca è stato quello di utilizzare un ampio

pannello anticorpale per valutare la cross-reattività, in tessuti di diverse specie ittiche, di anticorpi commerciali usati nel nostro laboratorio, ricorrendo all'allestimento di *tissue array*, per ottimizzare tempi di lavorazione e quantità di reagenti impiegati.

MATERIALI E METODI

Sono stati campionati esemplari appartenenti a 12 differenti specie ittiche di interesse commerciale: marine (*Sparus aurata*, *Dicentrarchus labrax*, *Trigla lucerna*, *Solea solea*), d'acqua dolce fredda (*Salmo salar*, *Oncorhynchus mykiss*), d'acqua dolce calda (*Tinca tinca*, Figura 1, *Ictalurus melas*, *Anguilla anguilla*), pesci ornamentali (*Carassius auratus* e *Poecilia reticulata*) ed Elasmobranchi (*Scyliorhinus canicola*). Su ognuno di questi è stato eseguito l'esame autoptico completo. Dopo la registrazione di lunghezza e peso, sono stati prelevati vari tessuti e organi quali cute, muscolo, branchie, fegato/pancreas, rene, milza, gonadi, fissati in formalina tamponata al 10% per massimo 48h e successivamente passati in etanolo al 70%. I tessuti sono stati poi inclusi in paraffina e processati secondo le metodiche istologiche di routine, sono state tagliate al microtomo sezioni di tessuto dello spessore di 4 µm, successivamente colorate con Ematossilina-Eosina (EE).

Per la costruzione dei *tissue array*, ciascuna sezione istologica è stata attentamente valutata al fine di evitare artefatti e scegliere così la porzione migliore da prelevare, che è stata cerchiata con un pennarello indelebile. Sono stati costruiti *tissue array* per ciascun tessuto, disponendo in ordine, in un blocchetto di paraffina bianco, *core* del medesimo tessuto (es. fegato) delle diverse specie, ricavati mediante l'utilizzo di un puncher da 3 mm di diametro (Figura 2, 3).

Da ogni *tissue array* sono state poi tagliate sezioni seriate di 4 µm di spessore, processate per la colorazione IIC (metodo indiretto ABC kit LSAB, Dako) utilizzando le tecniche in uso nel nostro laboratorio e standardizzate per cane e gatto (Figura 4). Gli anticorpi testati sono riportati in Tabella 1.

Alla processazione IIC sono stati aggiunte sezioni di tessuti di mammiferi di casi d'archivio come controllo positivo e una sezione del *tissue array* come controllo negativo.

RISULTATI

Sono stati realizzati 6 *tissue array*, ciascuno portatore di 12-20 *core*, corrispondenti a 84 campioni di diversi tessuti dalle diverse specie ittiche considerate. Su questi è stata valutata la reattività di 21 anticorpi, selezionando i tessuti in base alla reattività immunostochimica attesa. In totale sono state processate per l'immunostochimica 53 sezioni di *tissue array*, corrispondenti a 756 determinazioni immunostochimiche "tradizionali".

Dei 21 anticorpi testati, sette sono risultati immunoreattivi con una reattività omogenea nelle specie e coerente con quella attesa, in particolare CKAE1/AE3 (Figure 5 e 6), CK5/6, Caderina-E, vimentina, CD117 (Figura 7), sinaptofisina e h-TERT (Figura 8). Nove hanno mostrato una reattività non omogenea nelle specie testate o espressione aspecifica (CK19, CK14, FVIII-RA, CD3, CD18 felino, CD79, MAC387, Cromogranina A, MIB1) e cinque sono risultati non immunoreattivi (desmina, actina del muscolo liscio, CD18 canino, CD45-RA, S100).

DISCUSSIONE

I risultati ottenuti da questo studio sono stati globalmente soddisfacenti, in quanto dei 21 anticorpi testati, 7 hanno prodotto una cross-reattività sulle sezioni istologiche allestite. Tali anticorpi inoltre hanno manifestato solitamente una buona specificità, producendo i risultati attesi. In particolare, le citocheratine ad ampio spettro AE1/AE3 hanno fornito buoni risultati, coerenti con quelli attesi: oltre alla positività delle cellule dell'epidermide e delle branchie, nel fegato di tutte le specie esaminate, l'epitelio dei dotti biliari ha rivelato costantemente una immunoreattività di grado intenso, a conferma di quanto riportato da

Bunton (1993), che riferisce una positività di questi elementi cellulari in tessuto epatico, fissato sia in formalina sia in Bouin, di medaka (*Oryzias latipes*) e striped bass (*Morone saxatilis*).

Nei casi invece in cui sono state riscontrate reattività "aspecifiche" e/o "nulle" sono da prevedere ulteriori prove di laboratorio, per individuare la diluizione d'uso ottimale dell'anticorpo da testare.

La tecnica del *tissue array* ha permesso di ridurre in modo molto significativo il numero di prove immunostochimiche, portando a un notevole risparmio in termini di tempo e di reagenti utilizzati.

I risultati ottenuti permettono quindi di estendere l'applicazione della metodica IIC anche alle specie ittiche, allo scopo di identificare le componenti tissutali di interesse ed operare quindi un confronto inter-specifico dei differenti aspetti istologici. La metodica del *tissue array* si è rivelata vantaggiosa come strumento per indagare organi compatti, come i parenchimi epatico, renale e splenico.

BIBLIOGRAFIA

- Bunton TE (1993). *The immunocytochemistry of cytokeratin in fish tissues. Vet Pathol* **30**:418-425
- De Girolamo P, Ariamone N, Gargiulo G (2000). *S100-like protein in the goldfish (Carassius auratus) kidney. An immunohistochemical study. Cell Tissue Res* **302**:135-138
- Fischer U, Koellner B (2007). *Cross-reactivity of human leukocyte differentiation antigen monoclonal antibodies on carp and rainbow trout cells. Vet Immunol Immunopathol* **119**:142-155
- Rich A, Leddon SA, Hess SI, Gibbons SJ, Miller S, Xu X, Farrugai G (2007). *Kit-like immunoreactivity in the zebrafish gastrointestinal tract reveals putative ICC. Dev Dynam* **236**:903-911

| Anticorpo primario | Diluizione | Immunoreattività | | | | | |
|-------------------------------|------------|---|--|---|--|---------------------------------|--|
| | | Cute e muscolo | Branchie | Fegato / pancreas | Rene | Milza | Gonadi |
| Cheratina AE1/AE3 (Dako) | 1:50 | epidermide (tutti gli strati) | epitelio lamellare, cellule mucipare | epatociti, dotti biliari, acini pancreatici | capsula di Bowmann, tubuli, dotti collettori | non testato | epitelio follicolare ovarico |
| Citocheratina 5/6 (Zymed) | 1:100 | epidermide (tutti gli strati) | epitelio lamellare, cellule mucipare | nessuna reattività | nessuna reattività | non testato | nessuna reattività |
| Citocheratina 14 (Neomarkers) | 1:300 | nessuna reattività | immunoreattività aspecifica | nessuna reattività | non testato | non testato | non testato |
| Citocheratina 19 (Dako) | 1:50 | immunoreattività aspecifica | immunoreattività aspecifica | nessuna reattività | non testato | non testato | non testato |
| Caderina E (BD Biosciences) | 1:100 | non testato | epitelio lamellare, istiociti | non testato | non testato | non testato | non testato |
| Vimentina (Dako) | 1:100 | condrociti, miofibre | istiociti, miofibre, condrociti dell'asse lamellare | non testato | endotelio e mesangio glomerulare, istiociti | istiociti, endotelio ellissoidi | nessuna reattività |
| Desmina (Dako) | 1:50 | nessuna reattività | non testato | non testato | non testato | non testato | non testato |
| α -Actina (Dako) | 1:100 | nessuna reattività | non testato | non testato | non testato | non testato | non testato |
| FVIII-RA (Dako) | 1:1500 | non testato | nessuna reattività | nessuna reattività | non testato | immunoreattività aspecifica | non testato |
| CD3 (Dako) | 1:75 | non testato | non testato | non testato | immunoreattività aspecifica | immunoreattività aspecifica | non testato |
| CD18 canino (Dr. P. F. Moore) | 1:20 | non testato | non testato | non testato | non testato | nessuna reattività | non testato |
| CD18 felino (Dr. P. F. Moore) | 1:20 | non testato | non testato | non testato | non testato | immunoreattività aspecifica | non testato |
| CD45-RA (Dr. P. F. Moore) | 1:20 | non testato | non testato | non testato | non testato | nessuna reattività | non testato |
| CD79 (Dako) | 1:10 | non testato | non testato | non testato | immunoreattività aspecifica | immunoreattività aspecifica | non testato |
| CD117 (Dako) | 1:100 | epidermide (tutti gli strati), cellule "club", miofibre | epitelio lamellare, cellule mucipare, miofibre, condrociti, cellule granulari eosinofile | non testato | endotelio glomerulare, tubuli | cellule mieloidi | spermatogoni, cellule interstiziali ovariche |
| MAC387 (Dako) | 1:100 | non testato | non testato | nessuna reattività | immunoreattività aspecifica | immunoreattività aspecifica | non testato |
| S100 (Dako) | 1:1600 | non testato | non testato | non testato | non testato | nessuna reattività | non testato |
| CromograninaA (Dako) | 1:500 | non testato | non testato | immunoreattività aspecifica | immunoreattività aspecifica | non testato | non testato |
| Sinaptofisina (Dako) | 1:20 | non testato | non testato | pancreas endocrino | non testato | non testato | non testato |
| MIB1 (Dako) | 1:30 | nessuna reattività | nessuna reattività | non testato | non testato | immunoreattività aspecifica | immunoreattività aspecifica |
| h-TERT (Novocastra) | 1:50 | epidermide (tutti gli strati), cellule "club" | epitelio lamellare, granulociti | non testato | non testato | non testato | spermatogoni, oociti previtellogenici |

Tabella 1 Pannello anticorpale impiegato e risultati ottenuti nei tessuti testati.



Figura 1. Esemplare di Tinca tinca.

Figura 2, 3. Fasi della costruzione dei tissue arrays.

Figura 4. Blocchetto di un tissue array da cui sono state allestite sezioni istologiche sottoposte a colorazione IIC

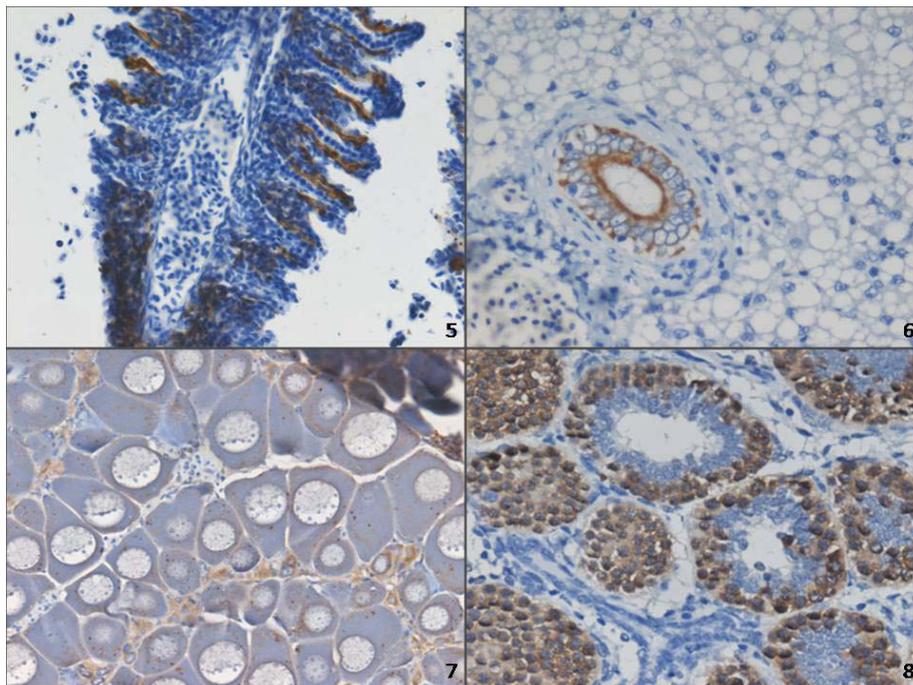


Figura 5. CitocheratineAE1/AE3, branchie di carasside: immunopositività citoplasmatica dell'epitelio delle lamelle secondarie. Cromogeno DAB, colorazione di contrasto Ematossilina di Papanicolau (40x).

Figura 6. CitocheratineAE1/AE3, fegato di gattuccio: immunopositività citoplasmatica dell'epitelio dei dotti biliari. Cromogeno DAB, colorazione di contrasto Ematossilina di Papanicolau (40x).

Figura 7. CD117, ovaio di orata: immunopositività citoplasmatica delle cellule interstiziali. Cromogeno DAB, colorazione di contrasto Ematossilina di Papanicolau (40x).

Figura 8 Subunità catalitica della telomerasi (h-TERT), testicolo di gattuccio: immunopositività nucleare delle cellule immature (spermatogoni). Cromogeno DAB, colorazione di contrasto Ematossilina di Papanicolau (40x).

IMMUNOHISTOCHEMISTRY IN FISHES. VALIDATION OF AN ANTIBODY LIBRARY USING A TISSUE ARRAY TECHNIQUE

Few studies have used immunohistochemistry (IHC) to characterize fish tissues, probably because commercial antibodies used as tissue markers are directed against mammalian antigens, and there are no guarantees of cross-reactivity in fishes.

The aim of this research was to test a panel of commercial Abs commonly used in veterinary laboratories on a variety of fish tissues to verify their cross-reactivity, if any, when compared with mammal tissues. Twelve different fish species of commercial interest were sampled and various tissues (skin/muscle, gills, liver/pancreas, kidney, spleen, gonads) were formalin-fixed and paraffin-embedded. A tissue array was constructed for each tissue, in order to have several tissue portions in the same paraffin block and to save labour time and reagents; serial sections were cut at 4 μ m and stained with a standard IHC protocol.

Tested antibodies were directed against epithelial (CKAE1/AE3, CK5/6, CK14, CK19, E-cadherin), mesenchymal (vimentin, desmin, α -actina-sm, factor VIII-RA), haemopoietic (CD3, CD18, CD45, CD79 α , CD117, MAC387), nervous tissue (S100 protein), endocrine (chromogranin A, synaptophysin), and cell cycle antigens (Ki67, telomerase-hTERT).

Seven out of 21 antibodies tested (CKAE1/AE3, CK5/6, E-cadherin, vimentin, CD117, synaptophysin, hTERT) were immunoreactive, and positivity had the expected location. The reactivity had similar expression among the tested species. Our findings allows, when cross-reactivity is validated, to extend IHC application on fish species, in order to identify tissue and cell components.

Key words: immunohistochemistry, fish pathology, tissue array, cross-reactivity

EPENDIMOMA SPINALE IN UN CANE DI DUE ANNI DI ETÀ

Sfacteria Alessandra, Macrì Francesco, Perillo Laura, Rapisarda Giuseppe, Lanteri Giovanni

Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria, Sezione di Patologia, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Messina

L'ependimoma è un tumore del SNC che, negli animali domestici, si riscontra soprattutto nei ventricoli laterali, meno frequentemente nel terzo e quarto ventricolo, e raramente nel canale centrale del midollo spinale. Sono di seguito descritte le caratteristiche cliniche e morfologiche di un ependimoma spinale in un cane maschio, incrocio pastore del Caucaso di 2 anni d'età affetto da zoppia bilaterale con deficit propriocettivo ad ambedue gli arti posteriori. L'esame mielografico, eseguito in proiezione laterale, evidenziava un pattern intramidollare determinante un blocco della progressione del mezzo di contrasto. La divaricazione e l'assottigliamento bilaterale delle bande mielografiche risultava compatibile con una diagnosi di neoplasia. All'esame necroscopico, l'apertura del canale vertebrale evidenziava, lungo la porzione lombare, una massa ovoidale, compatta, di colorito bianco perlaceo, delle dimensioni di cm 3x2. L'esame citologico mostrava una numerosa popolazione di cellule caratterizzate da citoplasma a limiti non ben definiti, spesso arrangiate in gruppi lassamente coesi e talora a disposizione perivascolare. I nuclei, di forma e dimensione variabile, prevalentemente piccoli e rotondeggianti con cromatina da reticolare a medie zolle. Nucleoli non visibili e mitosi non determinabili. Presenti talora cellule ad ampio citoplasma vacuolizzato riconducibili verosimilmente a microglia attivata. All'esame istologico, la massa risultava altamente cellulare, non incapsulata, formata da cellule ependimali neoplastiche con focolai necrotici ed emorragici. Le cellule presentavano forma ovoidale con bordi indistinti e citoplasma allungato ed eosinofilo. I processi citoplasmatici creavano una fitta rete fibrillare. I nuclei erano di forma da rotondeggianti ad ovoidale con cromatina a zolle. Era facilmente evidenziabile la caratteristica polarizzazione delle cellule per formare le c.d. pseudorosette con stroma fibrovascolare al centro. L'immunoistochimica mostrava una forte positività delle cellule neoplastiche a GFAP e Vimentina, soprattutto nelle pseudorosette, confermando la diagnosi istologica di ependimoma.

Parole chiave: ependimoma, cane, midollo spinale

SPINAL CORD EPENDYMOMA IN A 2 YEAR OLD DOG

Ependymoma is a rare tumor in domestic animals. It occurs mainly within lateral ventricles, less often in the third and fourth ventricle, and rarely within the central canal of spinal cord. A 2 year old dog, was presented with a history of bilateral lameness and loss of proprioception of forelimbs. At myelographic examination, an intramedullary pattern, blocking the progression of contrast medium, was observed. At necropsy, a 3x2 cm white-greyish mass occupying space was found at the lumbar segment. The cytological examination showed a cellular specimen composed of cells with no clear cytoplasm, forming loosely cohesive aggregates sometimes around vessels. The nuclei were mainly small and round with lacy or clumped chromatin. At histological examination, the mass was highly cellular and constituted by ovoid cells with indistinct borders, elongated eosinophilic cytoplasm and round to oval vesicular nuclei. Cytoplasmic processes formed a fibrillar network wherein many pseudorosettes around a fibrovascular stroma were observed. Immunohistochemically, vimentin and GFAP immunoreactivity was strongly present in the neoplastic cells especially around pseudorosettes, thus confirming the diagnosis of ependymoma.

Key words: dog, ependymoma, spinal cord

IL VAIOLO DEL CANARINO: RILIEVI ANATOMO-ISTOPATOLOGICI

Todisco Gianluca¹, Moreno Ana², Luppi Andrea², Marruchella Giuseppe³

¹Medico Veterinario Libero Professionista, Fiduciario Federazione Ornicoltori Italiani, Teramo.

²Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna "B. Umbertini", Brescia. ³Università degli Studi di Teramo, Facoltà di Medicina Veterinaria, Dipartimento di Scienze Biomediche Compare, Teramo

Il vaiolo del canarino (*Serinus canaria*) è una grave malattia infettiva e contagiosa sostenuta da un virus attualmente denominato *Avipox serinae* (famiglia *Poxviridae*).

Vengono di seguito descritti i principali rilievi patologici osservati in tre focolai di vaiolo verificatisi nel periodo 2006-2007 in altrettanti allevamenti di canarini di colore da esposizione delle province di Teramo, L'Aquila e Messina.

Le manifestazioni clinico-patologiche sono comparse durante l'attività riproduttiva. Le lesioni cutanee hanno tipicamente coinvolto aree prive di piumaggio (palpebre, estremità degli arti) e soltanto in un caso la superficie ventrale del collo. Tali lesioni esordivano sotto forma di papule ed evolvevano, successivamente, in pustole e croste rilevate di circa 2-5 mm di diametro. Si è, inoltre, osservato un contestuale aumento della mortalità dei nidiacei, associato ad una riduzione della percentuale di schiusa.

Venti canarini, provenienti dai tre diversi focolai e deceduti spontaneamente, sono stati sottoposti ad indagine necroscopica. Campioni tissutali sono stati fissati in formalina e processati come di routine per i necessari approfondimenti istopatologici. Sono attualmente in corso tentativi di isolamento virale mediante inoculazione di materiale sospetto (0.1 ml di una sospensione ottenuta dalle lesioni cutanee) sulla membrana corion-allantoidea di uova embrionate SPF di 9-11 giorni.

Le indagini istopatologiche condotte sulle lesioni cutanee hanno confermato il sospetto diagnostico, evidenziando la presenza delle seguenti alterazioni: ispessimento più o meno marcato dell'epidermide, degenerazione globiforme dei cheratinociti dello strato malpighiano, presenza di vescicole intraepiteliali associate ad un abbondante infiltrato infiammatorio intradermico, contestuale presenza di numerosi corpi inclusi intracitoplasmatici eosinofili di grandi dimensioni (cosiddetti corpi di *Bollinger*) ai quali viene attribuito significato patognomonico.

Le esperienze sopra riportate confermano la rilevanza del vaiolo nell'allevamento del canarino e sottolineano l'utilità delle indagini istopatologiche ai fini diagnostici.

Parole chiave: *Serinus canaria*, *Avipox serinae*, vaiolo aviare, lesioni macroscopiche, lesioni microscopiche, corpi di *Bollinger*

FOWL POX IN CANARY BIRDS: PATHOLOGICAL FINDINGS

Fowl pox in canary birds (*Serinus canaria*) is a severe infectious disease caused by *Avipox serinae* (family *Poxviridae*). Herein we report the major pathological findings observed in three different fowl pox outbreaks in canary breeders.

Symptoms appeared during the breeding season. Skin lesions presented as papules, pustules and crusts, 2-5 mm in diameter, and typically affected head, face and feet.

Twenty canaries, which spontaneously died, were submitted for necropsy. Tissue samples were collected and routinely processed for histopathology. Virological investigations are currently ongoing.

Microscopic examinations of skin lesions allowed us to confirm the diagnosis of fowl pox. The most relevant histopathological findings were: hyperplasia of the epidermis, ballooning degeneration of keratinocytes, intraepithelial vesicle formation, dermatitis, large eosinophilic intracytoplasmic inclusion bodies (so-called *Bollinger* bodies) which are considered pathognomonic.

Our report confirm fowl pox as a major concern in canary breeders and remark the usefulness of histopathology as a diagnostic tool.

Key words: *Serinus canaria*, *Avipox serinae*, fowl pox, gross lesions, microscopic findings, *Bollinger* bodies.

MESOTELIOMA SCLEROSANTE INVASIVO IN UN CANE

Varello Katia, Pezzolato Marzia, *Rossi Francesca, *Zoppi Simona, Borlatto Laura, Bozzetta Elena

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

Un cane Pastore tedesco maschio di 5 anni, con storia clinica di vomito, diarrea, distensione addominale e difficoltà respiratorie è stato soppresso in seguito ad aggravamento delle condizioni cliniche. All'esame necroscopico si è potuto evidenziare nella cavità toracica la presenza di un essudato sieroso-emorragico e la presenza di neoformazioni multiple lardacee a livello della pleura parietale e viscerale e del pericardio. In addome erano presenti neoformazioni nodulari diffuse nel peritoneo parietale e viscerale associate a peritonite fibrinosa e formazione di aderenze tra gli organi. Si è proceduto al prelievo ed alla fissazione in formalina di porzioni delle sierose interessate e di tutti gli organi per l'esame istopatologico con colorazione ematossilina eosina. Microscopicamente, a livello pleurico e pericardico, si apprezzava un'imponente neoformazione infiltrante caratterizzata da grosse cellule rotonde, singole o in piccoli cluster, con nuclei grandi e pleomorfi, nucleoli prominenti e rare mitosi, frammiste a cellule allungate disposte in fasci con membrane indistinguibili, citoplasma eosinofilo e nuclei grandi ed ovalari e con rari nucleoli. In alcuni casi si potevano osservare cellule bi- o multi-nucleate. Un quadro simile era evidente a livello di tutte le sierose degli organi addominali ma non a livello parenchimale. La colorazione immunohistochimica con gli anticorpi monoclonali anti-citocheratina ed anti-vimentina ha evidenziato nelle cellule epitelioidee neoplastiche precedentemente descritte positività citoplasmatica ad entrambi gli anticorpi mentre i fibroblasti sono risultati positivi solo alla vimentina. Sulla base del riscontro istopatologico ed immunohistochimico è stata formulata una diagnosi di mesotelioma sclerosante. Questa neoplasia è una forma rara nel cane e nel caso oggetto dello studio, di particolare interesse risulta la diffusione della neoplasia, presente sia in cavità toracica che addominale.

Parole chiave: cane, mesotelioma, torace, addome.

INVASIVE SCLEROSING MESOTHELIOMA IN A DOG

A 5-year-old male German shepherd dog with clinical history of vomiting, diarrhoea, abdominal distension and respiratory failure was euthanized. At postmortem examination the thorax cavity showed serosanguineous fluid and multiple laid masses located in parietal and visceral pleura and pericardium. In the abdomen multiple nodules on parietal and visceral peritoneum, fibrinous peritonitis and adhesion between the organs were observed. Sections of pleura, pericardium, peritoneum and organs were fixed in 10% buffered formalin for histopathological examination with haematoxylin and eosin. Microscopically, pleura and pericardium showed fibrous thickening composed by a population of large and round cells, single or in small clusters, with large and pleomorphic nuclei, prominent nucleoli and rare mitoses interspersed between spindle-shaped cells with indistinct borders, eosinophilic cytoplasm with large, oval nuclei and rare nucleoli. Bi- or multi-nucleated cells were also present. Same features were observed in the peritoneum. Further sections were performed for immunohistochemical characterization with monoclonal antibody anti-cytokeratin and anti-vimentin. Cytoplasm of the neoplastic cells were positive to both antibody while spindle cells showed positivity for vimentin only.

Based on histological and immunohistochemical findings diagnosis of sclerosing mesothelioma was made. This neoplasm is rare in dog and this case was peculiar for being diffuse both in thorax and abdominal cavity.

Key words: canine, mesothelioma, thorax, abdomen.

MICROFTALMIA ED AFACHIA ASSOCIATE AD ANOMALIE DI SVILUPPO OCULARE IN UN CERVO (*CERVUS ELAPHUS*) SELVATICO DELL'ETÀ DI DUE MESI

Vascellari Marta¹, Vercelli Antonella³, Carminato Antonio¹, Luchesa Lucio⁴, Pasolli Claudio², Cova Mariapia², Mutinelli Franco¹

¹SC3 Diagnostica Specialistica, ²SC9 Animali e Ambiente, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università 10, 35020 Legnaro (PD), Italy; ³Ambulatorio Veterinario Associato, C/so Traiano 99/d, 10135 Torino, Italy; ⁴Associazione Cacciatori Trentini, via Gardini, 41, 38100 Trento

È descritto un caso di anomalia congenita di sviluppo oculare in un cervo europeo (*Cervus elaphus*) di circa due mesi di età, proveniente dalla riserva naturale di "Bresimo", in provincia di Trento. Il soggetto, che clinicamente evidenziava microftalmia bilaterale, una volta accertata la grave menomazione e l'impossibilità di una riabilitazione, è stato sottoposto ad eutanasia per accertare la causa della cecità ed escludere patologie infettive. L'esame necroscopico non ha evidenziato ulteriori alterazioni a carico degli organi interni. I bulbi oculari sono stati fissati in formalina tamponata al 10% e processati per l'allestimento del preparato istologico. L'esame microscopico ha evidenziato assenza del cristallino; al posto del cristallino, in prossimità dei corpi ciliari, si osservava una proliferazione epiteliale con segni di differenziazione squamosa e focali aspetti secernenti, di probabile derivazione dall'epitelio non pigmentato dei corpi ciliari. Si osservava inoltre distacco di retina che appariva più volte ripiegata su se stessa con segni di displasia, presenza di materiale proteinaceo eosinofilo (distacco sieroso fra epitelio pigmentato e neuroretina), edema e alterazioni nella stratificazione di fotorecettori, cellule bipolari e ganglionari della retina. L'iride non era distinguibile dallo stroma corneale, come anche la membrana di Descemet. Nello stroma corneale si osservavano nidi epiteliali, con differenziazione squamosa e cellule mucipare. In base ai reperti istopatologici è stata emessa diagnosi di microftalmia ed afachia, associate ad anomalie congenite di sviluppo in vari distretti oculari.

In letteratura sono descritti pochi casi di anomalie congenite oculari nel cervo e poco si conosce sulle cause di questo sviluppo anomalo. In particolare, vengono considerate quali cause più probabili anomalie cromosomiche e ingestione di sostanze tossiche.

Parole chiave: afachia, cervo europeo, microftalmia, occhio

MICROPHTHALMIA AND APHAKIA WITH ASSOCIATED OCULAR DEFECTS IN A 2-MONTH-OLD FREERANGING EUROPEAN RED DEER (*CERVUS ELAPHUS*)

A 2-month-old free-living European red deer (*Cervus elaphus*) was found wandering in the "Bresimo" natural reserve of Trento province (northern Italy). Clinically, the animal showed bilateral microphthalmia. The animal was euthanised and underwent complete post mortem examination to exclude any further lesions. The eyes were fixed in 10% neutral buffered formalin, routinely processed for histology, paraffin embedded, sectioned at 3 µm, and stained. With haematoxylin and eosin. Multiple abnormalities were observed by histological examination: the lens was not present and replaced with a proliferation of squamous epithelial cells; retinal dysplasia and serous detachment between the pigment epithelium and the photoreceptor layer were observed. Hyperplastic squamous epithelial cells and mucinous glands were observed within the corneal stroma. The Descemet's membrane and the iris were not distinguishable from corneal stroma. On the basis of histological findings a diagnosis of congenital microphthalmia and aphakia, associated with congenital development abnormalities in multiple ocular structures was made. Congenital ocular abnormalities have been rarely described in cervid species, and little is known about the aetiology of this anomalous development. Chromosomal abnormality and exposure to toxic substances have been hypothesized as probable causes.

Key words: aphakia, European red deer, microphthalmia, eye

INDAGINI ANATOMOPATOLOGICHE SU TARTARUGHE *CARETTA CARETTA* RINVENUTE SULLA COSTA PUGLIESE

Zizzo N.¹, Appino S.², Prearo M.³, Anfossi A.², Zucca D.², Prunella V.¹, Villone V.¹, Tinelli A.¹, Bollo E.⁴

¹Dipartimento di Sanità e Benessere Animale, Università degli Studi di Bari. ²Dipartimento Patologia e Clinica Veterinaria, Università degli Studi di Sassari. ³Istituto Zooprofilattico Sperimentale- Torino. ⁴Dipartimento Patologia Animale, Università degli Studi di Torino

Alla luce delle ricerche bibliografiche effettuate sulle patologie dei cheloni, la patologia renale è stata raramente oggetto di studio e le poche notizie presenti si riferiscono essenzialmente alle tartarughe terrestri. Nel presente lavoro sono state esaminate 49 carcasse di tartarughe marine spiaggiate lungo la costa pugliese, appartenenti alla specie *Caretta caretta*. I soggetti, dopo essere stati classificati per specie e sesso, pesati e valutati morfometricamente, sono stati sottoposti ad esame autoptico e ad indagini anatomico-istopatologiche e batteriologiche. Per gli esami istopatologici, gli organi campionati sono stati fissati in formalina, sezionati e colorati con ematossilina-eosina, tricromica di Masson e Azan Mallory. Per gli esami batteriologici sono stati esaminati campioni di fegato, rene, polmone e cuore. La ricerca è stata eseguita con terreni di arricchimento (Selenite Broth Base e Pepton Water) e successivo trapianto su terreno selettivo e differenziale (Brilliant Green Agar e Mac Conkey Agar). Gli stessi campioni sono inoltre stati seminati su Columbia Blood Agar, Columbia CNA Agar e Aeromonas agar. L'identificazione è stata effettuata per mezzo del sistema di identificazione API 20 NE (bioMérieux). Gli esami anatomico-istopatologici del rene hanno messo in evidenza disturbi di circolo, processi degenerativi e reattività flogistiche acute e croniche (glomerulonefrite acuta, cronica e nefrite interstiziale). Gli esami batteriologici hanno permesso di isolare numerose specie batteriche, alcune delle quali correlabili a specifiche lesioni d'organo (*Moraxella* spp., *Aerococcus viridans*, *Aeromonas* spp.).

Non sono da escludere infine fattori ambientali che, da soli o in associazione con altre cause anche batteriche, possono avere alterato lo stato fisiologico delle tartarughe.

Parole chiave: tartaruga, *Caretta caretta*, rene, patologia

PATHOLOGY OF SEA TURTLES *CARETTA CARETTA* FOUND ON THE COAST OF APULIA (SOUTH ITALY)

On the basis of the most recent scientific literature, little is known on sea turtle renal pathology, as most published data mainly regard tortoises. The authors examined 49 carcasses of sea turtles belonging to the species *Caretta caretta*, stranded on the coasts of Apulia (South Italy). The subjects were classified by species and gender, weighed, morphometrical assessed, and submitted to pathological and bacteriological examinations. For histopathological examinations, tissues were formalin-fixed and submitted to Haematoxylin-Eosin, Masson trichromic and Azan Mallory stains. For bacteriological tests, samples of liver, kidney, lung and heart were examined. The tests were carried out on enrichment media (Selenite Broth Base and Pepton Water) and subsequent selective and differential media (Brilliant Green Agar and Mac Conkey Agar). The same samples were also plated on Columbia Blood Agar, Columbia CNA Agar and Aeromonas agar. The identification was carried out with the API 20 NE system (bioMérieux).

Anatomico- and histo-pathological examinations of the kidney revealed several lesions, including disturbances of circulation, degenerations, and acute and chronic inflammatory processes (acute and chronic glomerulonephritis, and interstitial nephritis).

Several bacterial species were isolated, some of which related to specific lesions (*Moraxella* spp., *Aerococcus viridans*, *Aeromonas* spp.). Among other causes, environmental factors, alone or in combination with other bacterial agents, may also have altered the physiological state of turtles.

Key words: turtle, *Caretta caretta*, kidney, pathology

VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF) NELL'ATTIVITÀ ANGIOGENETICA DEI MASTOCITOMI CANINI

Zizzo Nicola¹, Patruno Rosa¹, Tinelli Antonella¹, Passantino Letizia¹, Arpaia N², Ranieri Girolamo³

¹ Dipartimento di Sanità e Benessere degli Animali – Università degli Studi di Bari. ² Dipartimento di Medicina Interna, Immunologia e Malattie infettive – Bari. ³ IRCCS - Istituto Tumori Giovanni Paolo II - Bari

Il mastocitoma, proliferazione neoplastica di mastociti, ha una incidenza molto elevata nel cane. Secondo il sistema di graduazione di Patnaik, in base al grado di differenziazione e all'indice mitotico delle cellule neoplastiche si distinguono nel mastocitoma canino tre tipi citologici: ben differenziato (Grado I), intermedio (grado II) e anaplastico (grado III). I mastocitomi di I e II grado hanno in genere un comportamento biologico e clinico benigno, mentre quelli di III grado sono maligni e metastatizzano in un primo tempo nei linfonodi, poi in vari organi interni, soprattutto nel fegato, nella milza e nel midollo osseo.

Nel presente lavoro sono stati analizzati 86 mastocitomi di grado differente con lo scopo di valutare i livelli del Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) nel plasma ricco di piastrine attivate (P-APR) e il ruolo della densità microvascolare (MVD), e di correlarli tra loro.

Il livello di VEGF circolante è stato esaminato usando il Quantikine Human VEGF-ELISA (R & D System Inc., Minneapolis, MN). Per la valutazione della MVD e della densità dei mastociti sono state usate tecniche di istochimica e di immunoistochimica. La positività alle tecniche di colorazione è stata stimata usando un sistema di analisi d'immagine (Quantimet 500 Leica).

I livelli di VEGF da P-APR e la MVD sono risultati significativamente più alti in mastocitomi di III grado piuttosto che in quelli di I e II (con range di p rispettivamente da 0.001 a 0.004, con il test t-student). Inoltre, in mastocitomi di III grado è stata trovata una significativa forte correlazione tra i livelli di VEGF da P-APR e la MVD (rispettivamente il range di r da 0.71 a 0.82, il range di p da 0.001 a 0.002, con analisi di Pearson).

Poiché i livelli di VEGF e di P-APR sono correlati con l'attività angiogenetica del tessuto e il grado di malignità della neoplasia, gli autori suggeriscono che il mastocitoma possa probabilmente essere un surrogato adatto per i markers angiogenetici interspecie della progressione tumorale. Inoltre il mastocitoma sembra essere un modello di studio per il ruolo delle mast cells (MCs) nel percorso angiogenetico, di conseguenza l'inibizione della degranulazione o l'attivazione delle MCs potrebbe essere un nuovo target anti-angiogenetico degno di ulteriori indagini.

Parole chiave: mastocitoma, Vascular Endothelial Growth Factor, angiogenesi

VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF) IN MAST CELL TUMOR OF DOG

The dog mast cell tumor, a neoplastic proliferation of mast cells, has a very elevated incidence in the dog. According to the graduation system of Patnaik, canine mast cell tumors can be distinguished in three cytological types: well-differentiated (Grade I), moderately differentiated (Grade II) and poorly differentiated (Grade III). The grade I and II mast cell tumor generally have a benign biological and clinical behavior, while G III tumor are malignant and have a metastatic potential in the lymph nodes, then in internal organs, especially in the liver, in the spleen and in the bone marrow.

To evaluate the role of angiogenesis in progression of this tumor and to analyse the levels of the Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in the plasma rich in activated platelets (P-APR) and the role of the microvascular density (MVD), and to correlate MVD and VEGF, in the present study 86 mast cell tumor of different grade was investigated.

The level of circulating VEGF has been examined using the Quantikine Human VEGF-ELISA (R & D System Inc., Minneapolis, MN). Histochemistry and immunohistochemistry techniques have been used for the evaluation of the MVD and the density of the mast cells. By use an image system analysis (Quantimet 500 Leicas) the positive results to coloration has been esteemed.

Results showed that levels of VEGF from P-APR and MVD were significantly higher in poorly differentiated (G III) mast cell tumor than in intermediate (G II) and well differentiated (G I) mast cell tumor (with range of p respectively from 0.001 to 0.004, with the t-student test) and that levels of VEGF from P-APR and the MVD were significantly correlated in G III, but not in G I and G II subgroups (respectively r's range from 0.71 to 0.82, p's range from 0.001 to 0.002, with analysis of Pearson).

Since the levels of VEGF and P-APR are correlated with the angiogenetic activity of the tissue and the grade of tumor, the authors suggest that mast cell tumor can probably be a surrogates inter-species angiogenetic markers of tumoral malignancy.

Besides, the mast cell tumor can be an interesting model to study the role of the mast cells (MCs) in angiogenesis. Accordingly, the inhibition of the mast cells degranulation or the activation of the MCs could be a new anti-angiogenesis target for further investigations.

Key words: mast cell tumor, Vascular Endothelial Growth Factor, angiogenesis