

A.P.I.V.

***Associazione Italiana
Patologi Veterinari***



***ATTI del XX Congresso Nazionale
“Aggiornamenti in Patologia Veterinaria”
Fossano (CN) 24-25 Maggio 2002***

**PROVA PRATICA DI PATOLOGIA MACROSCOPICA
(SIMULAZIONE DELL'ESAME
DELL'EUROPEAN COLLEGE OF VETERINARY PATHOLOGISTS - ECVP)**

E. Scanziani

Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria
Sezione di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviare, Facoltà di Medicina Veterinaria di Milano

La patologia macroscopica è una delle 5 parti in cui è suddiviso l'esame dell'European College of Veterinary Pathologists (ECVP). Essa consiste nella proiezione di 60 diapositive di reperti anatomo-patologici macroscopici per ognuna delle quali vengono richieste sintetiche risposte scritte in lingua inglese a specifiche domande nello spazio di 2 minuti. Per ogni diapositiva viene indicata la specie animale in questione, raramente altri dati (come ad esempio il segnalamento).

Nella prima parte della relazione vengono presi in considerazione i principali aspetti necessari per un corretto approccio alla parte di patologia macroscopica dell'esame ECVP. Molte delle informazioni al riguardo sono contenute in un documento del Dr. B.H. Williams, reperibile sul sito Web (<http://www.afip.org/vetpath/>) dell'Armed Forces Institute of Pathology (AFIP).

La diagnosi morfologica è una domanda che viene posta in quasi tutti i casi. Oltre alla diagnosi anatomo-patologica propriamente detta essa comprende: 1) l'organo colpito (a volte l'organo è già indicato nel nome della patologia ad esempio quando si tratta di processi infiammatori); 2) la distribuzione della/e lesione(i) (focale, multifocale, disseminata, transmurale, diffusa, a focolai confluenti, localmente estesa, lineare, unilaterale/bilaterale, simmetrica); 3) la gravità (lieve, moderata, grave); 4) l'andamento (acuto, subacuto, cronico). Esistono alcune eccezioni: 1) i tumori, per i quali si indica semplicemente l'organo e il tipo di tumore, es: linfoma renale; 2) le malformazioni, per le quali si utilizza solo il nome della lesione, es: palatoschisi, atresia anale. Talvolta sono presenti 2 o più diagnosi morfologiche non raramente tra loro correlate come ad esempio atrofia conseguente alla presenza di una neoformazione.

Oltre alla diagnosi morfologica possono essere richiesti il nome della malattia/patologia, la diagnosi eziologica, l'eziologia, le diagnosi differenziali. Più raramente può essere richiesta la patogenesi.

Durante la relazione viene simulata una prova di patologia macroscopica simile a quella dell'esame ECVP ed anche a quella che viene organizzata settimanalmente al Training Post Laurea (TPL) in Patologia Veterinaria di Milano. Dopo aver distribuito un questionario contenente le domande, vengono proiettate 20 immagini e ognuna di esse viene opportunamente commentata.

Ciascuna immagine esemplifica un particolare aspetto riferito alla prova di patologia macroscopica dell'ECVP, come ad esempio la difficoltà ad utilizzare una corretta terminologia in lingua inglese, oppure come scrivere brevemente una complessa patogenesi, o ancora come riconoscere comuni malattie in animali poco comuni in patologia veterinaria (per esempio rettili), ecc.. A titolo di esempio in Fig. 1 viene riportato il caso n° 16 per il quale vengono richiesti, oltre alla diagnosi morfologica, il nome della malattia/patologia, l'eziologia e la patogenesi.

La relazione si conclude con alcuni consigli sul come prepararsi per questa parte dell'esame ECVP. Accanto ai tradizionali mezzi utilizzabili per la didattica quali archivi fotografici presenti nei vari Istituti, riviste e libri/atlanti oggi sono disponibili nuove straordinarie risorse per acquisire immagini delle più disparate lesioni. Ci si riferisce in particolare al Noah's Arkive che raccoglie migliaia di immagini in CD e ai numerosi siti Web dedicati all'anatomia patologica veterinaria che sono stati recentemente allestiti.

Da alcuni mesi è in atto, presso la sezione di Anatomia Patologica Veterinaria di Milano e a cura del Prof. M. Caniatti, la creazione di un archivio informatico di immagini relative a lesioni macroscopiche corredate da una serie di domande poste in lingua inglese secondo le regole sopra esposte. L'archivio permette di visualizzare in modo interattivo le risposte corrette, di scegliere i casi secondo la specie, ecc. Attualmente sono inseriti 250 casi e 150 sono pronti per essere inseriti. In futuro verranno inseriti i casi che vengono settimanalmente proposti (generalmente 10) al TPL di Milano.

Legenda della [figura 1](#). - Case 16. Morphological diagnosis: severe locally extensive mandibular chronic granulomatous osteomyelitis. Name the condition: lumpy jaw (mandibular actinomycosis). Etiology: *Actinomyces bovis*. Pathogenesis: gingival injury by foreign body > A. bovis inoculation > periodontitis and osteomyelitis > osteolysis > periosteal proliferation > mandibular deformation.

ESPERIENZE DI COLLABORAZIONE TRA SERVIZIO OSPEDALIERO DI ANATOMIA PATOLOGICA E SERVIZIO VETERINARIO IN MEDICINA PREVENTIVA : RICERCHE DI PATOLOGIA COMPARATA

**M. Abrate, **G. Cravero, **M.C. Nicodemo, *C. Zavattero.*

* ASL17 – Servizio di Anatomia Patologica Ospedale di Savigliano.

** ASL 17 – Servizio Veterinario di Igiene Alimenti di Origine Animale Fossano-Savigliano

Si ritiene opportuno con la nostra documentazione illustrare sinteticamente un'esperienza che rientra pur sempre nell'ambito della formazione veterinaria permanente facendo rilevare che fin dal 1994 è stata promossa ed avviata un'iniziativa di collaborazione tra il servizio veterinario di Fossano-Savigliano ed il Servizio di Anatomia patologica dell'Ospedale di Savigliano. I riscontri di questa attività, portata avanti a livello aziendale ed interdisciplinare, sono sicuramente degni di nota, non solo per il numero degli accertamenti svolti ed i risultati ottenuti (oltre 700 esami istopatologici effettuati anche su materiale biotico e reperti anatomopatologici di animali appartenenti ad allevamenti di altre ASL), ma anche per l'impulso dato ad altre iniziative collaterali, ed in particolare: l'esecuzione di necroscopie in campo presso allevamenti di suini ed avicoli, ubicati nel territorio dell'ASL 17/1; le indagini sulla tbc bovina con le relative problematiche diagnostico-differenziali anatomo-istopatologiche.

I reperti istopatologici principali sono stati ottenuti da animali regolarmente macellati presso gli impianti situati nell'ambito della ASL 17/1 e riguardano:

le neoplasie (n.90) in animali da macello (bovini, suini, equini);

le zoonosi cosiddette "occulte" come sarcosporidiosi, aspergillosi e listeriosi ;

le lesioni organiche potenzialmente o direttamente connesse o rapportabili alla presenza di residui indesiderabili nelle carni;

gli approfondimenti diagnostici e diagnostico-differenziali della tbc bovina ed ovicaprina.

Di questa collaborazione medico veterinaria, tra servizio territoriale di prevenzione e servizio ospedaliero, sono da apprezzare non soltanto gli effetti pratici e tangibili, rappresentati dall'agevolazione e miglioramento dell'attività diagnostica e diagnostico-differenziale in patologia comparata, applicata principalmente all'ispezione degli animali da carne, dando la dovuta rilevanza ed attuazione alla funzione del macello come osservatorio epidemiologico, con ovvii riflessi positivi sulla salute umana ed animale, ma anche i risultati tecnico-scientifici con i contributi alla ricerca di base e la evidenziazione di patologie

animali poco conosciute nel territorio agro-zootecnico aziendale e di ASL limitrofe, che sono stati documentati da alcuni lavori pubblicati su riviste scientifiche nazionali, su notiziari tecnico-scientifici regionali, e da comunicazioni e relazioni dei Servizi di Anatomia Patologica e Veterinario, presentate in congressi, convegni ed aggiornamenti organizzati in sede locale, regionale ed universitaria o da società scientifiche.

Nella rassegna che produciamo in questo congresso riteniamo interessante dare un particolare rilievo agli accertamenti diagnostici eseguiti sulle forme tumorali spontanee degli animali in produzione zootecnica, quasi sempre della specie bovina, e riferire dei risultati di una ricerca sulla sarcosporidiosi nei bovini da carne, ultimata recentemente ed effettuata attraverso uno screening istologico sulla muscolatura striata di vitelli e vitelloni regolarmente macellati senza lesioni macroscopicamente apprezzabili ai gruppi muscolari sottoposti all'esame.

Tra le diverse neoplasie riscontrate meritano di essere segnalate soprattutto alcune lesioni evidenziate in bovini regolarmente macellati, che sia all'esame istopatologico sia con l'indagine immunoistochimica risultano morfostrutturalmente ed immunologicamente affini agli analoghi tumori umani: si fa riferimento in particolare a 2 casi di neurinoma (schwannoma) a carico delle sierose e del pancreas (Fig. 1) e ad un tumore endocrino del pancreas, metastatico al fegato, positivo alla cromogranina.

Per quanto concerne l'indagine sulla sarcosporidiosi in bovini regolarmente macellati, le ricerche sono state effettuate attraverso prelievi da 100 capi, esaminando in particolare la muscolatura striata annessa alle ghiandole sessuali secondarie (muscolatura uretrale, muscolo bulbo cavernoso nel maschio, muscolo costrittore del vestibolo della vagina nella femmina) ed il miocardio. Nella tab. I sono elencati il numero e la categoria dei bovini testati.

Tabella I.

CATEGORIA DI BOVINI TESTATI	NUMERO
Vitelloni maschi	51
Vitelloni femmine	10
Vitelli a carne bianca	33
Vacche	6
TOTALE	100

Nelle tab. II e III sono sintetizzati i risultati degli esami microscopici sulla muscolatura striata prelevata dalle diverse sedi

Tabella II. - POSITIVITA' RISCOINTRATA

N° Casi Osservati	N° Casi Positivi
100	55

Tabella III.

POSITIVITA' RISCOINTRATA NELLE CATEGORIE TESTATE

Categoria di animali testati	Numero	Positività
Vitelloni maschi	51	42
Vitelli a Carne Bianca	33	7
Vitelloni femmine	10	3
Vacche	6	3
Totale	100	55

Dall'analisi di questi riscontri si evince che l'incidenza più forte della sarcosporidiosi si registra nei giovani bovini di età compresa tra 18 e 20-22 mesi (vitelloni) nei quali interessa circa l'80% dei casi (Fig. 2).

Anche se la nostra indagine ha riguardato un numero limitato di animali, i dati ottenuti sono comunque assai importanti e degni della massima attenzione soprattutto dal punto di vista igienico-sanitario e zoonosico.

Una volta riaffermata la potenziale pericolosità per l'uomo di questo protozoo, si deve però sottolineare che in verità mancano adeguate ricerche che ne documentino la reale incidenza in popolazioni come quelle dove il consumo di carni crude è significativo (ad esempio certe zone del Piemonte, compreso il cuneese), determinando quindi un'esposizione a rischi maggiori.

Altro punto ancora oscuro è il rapporto percentuale di frequenza in bovini e suini da macello delle sarcocisti patogene per l'uomo rispetto a quelle patogene per altre specie animali (cane, gatto ecc..).

Manca, in altre parole, la possibilità di una rapida distinzione, con esami di laboratorio semplici e routinari, di *S. bovi-hominis* e di *S. sui-hominis* da altri sarcosporidi presenti nel maiale e nel bovino, ma non patogeni per l'uomo. Resta d'altro canto il fatto che la sarcosporidiosi, allo stato attuale delle cose, rappresenta una "zoonosi occulta" nel senso più completo del termine: le

possibilità di una diagnosi routinaria sulle carcasse degli animali macellati sono praticamente nulle. Non è infatti pensabile che in assenza di lesioni macroscopicamente apprezzabili, la visita sanitaria *post-mortem* delle carni, condotta con la comune tecnica e procedura ispettive, possa in alcun modo portare almeno ad un sospetto di sarcocistosi muscolare, e non è neppure ipotizzabile ricorrere ad un depistage sistematico della sarcosporidiosi nelle carni.

SUMMARY

The Authors believe it right to illustrate the result of cooperation between pathoanatomy service and veterinary service in preventive medicine. Beside the ordinary histological diagnostic activity on organic lesions of cattle regularly slaughtered, the authors relate about the results af sarcosporidian cyst histological research on 100 cattle slaughtered in a shambles located in ASL of Fossano-Savigliano.

[Figura 1.](#) Vacca: aspetto istopatologico di neurinoma a carico del pancreas. E.E. medio ingrandimento

[Figura 2.](#) Vitellone: sarcocisti localizzata in una fibra del PurKinje (app. di conduzione cardiaco) senza lesioni miocardiche evidenti. E.E. medio ingrandimento.

**ANATOMIA PATOLOGICA APPLICATA AI RETTILI:
DALL'OSSERVAZIONE EMPIRICA ALLA PATOGENESI MOLECOLARE**

F. C. Origgi

Laboratorio di Virologia Umana, Ospedale S. Raffaele (HSR) - Dibit - 20132 Milano,
Via Olgettina 58. Tel 02/26434913, Fax 02/26434905

L'interesse che l'anatomia patologica e la patologia sperimentale ha sviluppato nei confronti dei rettili e' relativamente nuovo. La crescente diffusione che questi animali stanno avendo come animali d'affezione in tutto il mondo, ha contribuito a creare le condizioni perché si sviluppasse una "nicchia" professionale vera e propria specifica per la medicina dei rettili. La conseguente maggiore disponibilità di mezzi finanziari, in alcuni casi anche considerevoli, e' stato un elemento determinante per l'avvio di sempre più numerosi progetti di ricerca che ha consentito di chiarire alcuni aspetti della patogenesi di numerose patologie caratteristiche di questo gruppo di animali. Di seguito verranno presentati alcuni esempi rappresentativi del lavoro di ricerca condotto negli ultimi 20 anni.

La micoplasmosi delle testuggini del deserto (*Gopherus agassizi*) [Jacobson et al., 1991 (b)] e delle testuggini della Florida (*Gopherus polyphemus*) (Brown et al., 1999) e' stata oggetto di approfondite indagini, anche a carattere sperimentale fin dall'inizio degli anni 90'. Si tratta di una malattia ad andamento cronico, considerata una delle cause del declino delle popolazioni di queste testuggini in USA, caratterizzata da segni clinici quali, lo scolo nasale e congiuntivite. Il nome di "patologia respiratoria del tratto superiore delle vie aeree" (upper respiratory tract disease –URTD-), e' indicativo della localizzazione focale della patologia che soltanto nelle fasi più progresse può essere associata a segni clinici di carattere più sistemico.

Uno studio di trasmissione ha dimostrato il ruolo chiave che il *Mycoplasma agassizi* (Brown et al., 1994/1999) ha nell'insorgenza e nello sviluppo della patologia. La microscopia elettronica ha consentito di osservare la presenza di micoplasmi in intimo contatto con le cellule dell'epitelio olfattorio che rivestono le cavità nasali di queste testuggini. L'infiltrato infiammatorio caratterizzato soprattutto dalla presenza di granulociti eterofili, e' associato ad una importante alterazione dell'architettura dell'epitelio stesso [Jacobson et al., 1991 (b)], che nelle forme più gravi può essere associato ad una severa compromissione delle capacità olfattorie dell'animale.

Un'altra patologia che ha destato l'interesse dei ricercatori e' stata l'herpesvirus delle testuggini. E' una patologia a diffusione mondiale nota fin dagli anni '80 col nome di "stomatite-rinite". Molte pubblicazioni hanno evidenziato l'associazione di questa patologia alla presenza di particelle virali compatibili con quelle tipiche dei membri della famiglia degli herpesviridae (Jacobson et al., 1985).

Le testuggini con stomatite-rinite presentano diversi segni clinici fra i quali stomatite e rinite (che hanno dato il nome alla malattia) insieme a congiuntivite, scolo oro-nasale e segni clinici meno localizzati al distretto anatomico oro-faringeo, come polmonite, sintomatologia nervosa e cachessia (Heldstab and Bestetti, 1989).

Un recente studio di trasmissione condotto su degli esemplari di *Testudo graeca* infettate sperimentalmente con uno di due ceppi di herpesvirus isolato da altrettanti esemplari sintomatici di *Testudo hermanni* ha consentito di riprodurre la maggior parte dei segni clinici compatibili con quelli descritti in letteratura come associati alla stomatite-rinite (Origgi et al., 2001),

La stomatite virale e' caratterizzata dalla formazione di placche fibrino-necrotiche che si sviluppano generalmente sulle parti molli del cavo orale. Queste placche possono regredire dopo essersi formate ed aver raggiunto dimensioni rilevanti. L'intero ciclo, caratterizzato dalla comparsa e dalla scomparsa di queste placche, può durare dalle due alle tre settimane, anche se le condizioni dl sistema immunitario della testuggine potrebbe influenzare considerevolmente i tempi descritti sopra.

La presenza di inclusioni eosinofile intranucleari (Figura 1) e' considerato il reperto critico per la diagnosi istopatologica di herpesvirosi delle tartarughe. Purtroppo, non sono noti "i tempi" necessari alla formazione ed eventuale scomparsa di tali inclusioni.

Tra i membri degli "squamata" una patologia che da circa 20 anni e' l'oggetto di un difficile lavoro di ricerca e' la malattia a corpi inclusi o "inclusion body disease" (IBD) (Schumacher et al., 1994).

Sebbene questa patologia sia stata osservata principalmente nei boidi, sono noti alcuni casi anche nei colubridi. Tra i segni clinici osservati nei serpenti colpiti da questa patologia, possiamo ricordare il rigurgito, la polmonite ma soprattutto la sintomatologia nervosa che trova la sua espressione più patognomonica in un particolare opistotono che gli anglofoni chiamano "Star gazing".

All'esame istologico e' caratteristico il riscontro di corpi inclusi intracitoplasmatici eosinofili che possono avere una distribuzione pressoché sistemica o invece essere localizzati in un numero più limitato di tessuti (Schumacher et al., 1994).

Fino ad oggi, l'agente eziologico proposto per questa patologia sarebbe un retrovirus isolato in diversi serpenti con IBD conclamata. Recentemente, l'isolamento di un reovirus da un boide con IBD conclamata, ha aperto la strada a nuove ipotesi eziopatogenetiche (Marschang, com. pers.).

Una delle patologie conosciute nei rettili di maggior interesse e' senza dubbio la fibropapillomatosi delle tartarughe marine [Jacobson et al., 1991 (a)]. Segnalata fin dagli anni '30, e' soltanto alla meta' degli anni '90 che ha cominciato ad essere oggetto di un attento ed approfondito lavoro di ricerca

(Herbst, 1995). La patologia sembra colpire maggiormente le tartarughe della specie *Chelonia mydas* (Green turtle), sebbene, sia stata segnalata anche nelle *Caretta Caretta* (Loggerhead) e nelle *Lepidochelis olivacea* (Olive ridley).

Le tartarughe colpite da questa patologia possono presentare innumerevoli neoformazioni sulla superficie esterna del corpo che possono interessare sia i tessuti molli ed anche quelli duri (piastrone e carapace). Tuttavia, e' noto che tali neoformazioni possono svilupparsi nel parenchima di organi interni quali reni e polmoni soprattutto.

Si tratta di neoformazioni a carattere benigno che talvolta possono anche regredire, sebbene non sia noto il meccanismo patogenetico di questo fenomeno.

Nella compagine fibrosa del papilloma non e' infrequente osservare la presenza di uova di spirochidi. Una serie di studi ha pero' dimostrato l'estraneità di tali uova nel meccanismo patogenetico della malattia (Herbst et al., 1998).

Uno studio sperimentale ha dimostrato l'eziologia infettiva della patologia (Herbst, 1995) ma non e' stato ancora individuato con certezza un agente causale.

Al di la' di tutto il lavoro svolto sino ad ora per investigare la patologia e la patogenesi di alcune delle malattie dei rettili, risulta chiaro che la sfida maggiore che ci si pone davanti per i prossimi anni sara' proprio lo studio e la comprensione delle dinamiche fisiologiche, fisiopatologiche e immunologiche di questi animali. La conoscenza dei loro parametri di base e' un elemento critico per la comprensione della meccanica dell'insorgenza e dello sviluppo delle patologie di questi lontani parenti dei dinosauri.

Figura 1. Polmone di *Testudo* spp con inclusioni virali da herpes. Nella compagine dell'epitelio polmonare iperplastico si nota un "cluster" di inclusioni intranucleari eosinofili compatibili con quelle descritte per i membri della famiglia degli herpesviridae (Ematossilina Eosina, 400x; barra= 10 µm).

Articoli citati.

Brown, M. B., G. S. McLaughlin, P. A. Klein, B. C. Crenshaw, I. M. Schumacher, D. R. Brown, and E. R. Jacobson. 1999. Upper respiratory tract disease in the gopher tortoises is caused by *Mycoplasma agassizii*. *J. Clin. Micro.* 37: 2262-2269.

Brown, M. B., I. M. Schumacher, P. A. Klein, K. Harris, T. Correll, and E.R. Jacobson. 1994. *Mycoplasma agassizii* causes upper respiratory tract disease in the desert tortoise. *Infect. Immun.* 62: 4580-4586.

Heldstab, A., and G. Bestetti. 1989. Herpesviridae causing glossitis and meningoencephalitis in land tortoises (*Testudo hermanni*). *Herpetopathologia*. 1: 5-9.

Herbst, H. L. 1995. The Etiology and Pathogenesis of Green Turtle Fibropapillomatosis. Doctoral Dissertation, University of Florida.

Herbst L. H., Greiner E. C., Ehrhart L. M., Bagley D. A., Klein P. A. 1998. Serological association between spirorchidiasis, herpesvirus infection, and fibropapillomatosis in green turtles from Florida. *J Wildl Dis*. 34: 496-507.

Jacobson, E. R., C. Buergelt, and B. Williams. 1991 (a). Herpesvirus in cutaneous fibropapillomas of the green turtle (*Chelonia mydas*). *Dis. Aquat. Org*. 12: 1-6.

Jacobson, E. R., S. Clubb, J. M. Gaskin, and C. H. Gardiner. 1985. Herpesvirus-like infection in Argentine tortoises. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 187: 1227-1229.

Jacobson, E. R., J. M. Gaskin, M. B. Brown, R. K. Harris, C. H. Gardiner, J. L. LaPointe, H. P. Adams, C. Reggiardo. 1991 (b). Chronic upper respiratory tract disease of free-ranging desert tortoises, *Xerobates agassizii*. *J. Wild. Dis*. 27: 296-316.

Origi, F. C, P. A. Klein, K. Mathes, S. Blahak, R. E. Marschang, S. J. Tucker and E. R. Jacobson. An Enzyme linked Immunosorbent Assay (ELISA) for Detecting Herpesvirus Exposure in Mediterranean Tortoises [Spur Thighed tortoise (*Testudo graeca*) and Hermann's tortoise (*Testudo hermanni*). *J Clin Micro*, 39: 3156-3163.

Schumacher, J., E. R. Jacobson, B. L. Homer, J. M. Gaskin. 1994. Inclusion body disease in boid snakes. *J. of Zoo and Wildlife Med*. 25: 511-524.

PATOLOGIA DA PREDAZIONE NEGLI ANIMALI SELVATICI

E. Bollo

Università degli Studi di Torino, Dipartimento di Patologia Animale, Via L. da Vinci 44 – 10095 Grugliasco (TO)

I grandi carnivori predatori (lupo, orso e lince) facevano parte, in passato, della fauna delle Alpi e degli Appennini. In seguito alla persecuzione venatoria da parte dell'uomo e alle modificazioni degli ambienti naturali e delle condizioni ecologiche verificatesi soprattutto nell'ultimo secolo, molti di essi sono scomparsi dal territorio italiano o ne sono rimaste poche residue popolazioni.

Grazie a recenti eventi di reintroduzione e di ripopolamento, nonché a fenomeni di naturale espansione delle popolazioni residue, si assiste negli ultimi anni a una loro progressiva ricomparsa. Altri importanti predatori, cosiddetti minori, sono inoltre la volpe, il tasso, il cinghiale, il gatto selvatico, la lontra, l'aquila reale, il gufo reale, i corvidi, il grifone, lo sciacallo dorato, il cane procione e il procione.

L'aumento della consistenza dei predatori fa dunque sì che l'impatto della loro presenza sugli ungulati selvatici e domestici stia assumendo una sempre maggiore rilevanza. E' pertanto importante che il personale addetto alle osservazioni in campo (personale di vigilanza ambientale, biologi, medici veterinari e soprattutto patologi veterinari) sia in grado di distinguere un evento di predazione da un episodio di morte accidentale.

Ai fini del riconoscimento della predazione e della possibile identificazione del predatore responsabile di tali episodi, è necessario operare in modo il più possibile sistematico, valutando gli elementi raccolti secondo i criteri individuati più avanti. Vanno comunque sempre tenuti in considerazione due importanti elementi: a) poiché tutti i predatori possono anche nutrirsi di carogne, è importante valutare se si tratta di un vero e proprio atto di predazione (con uccisione della preda), oppure di un semplice atto di necrofagia su un animale già morto; b) ogni predatore presenta caratteristiche di predazione tipiche della propria specie, tuttavia poiché tale "tipicità" presenta numerose variazioni, è necessario considerare più indizi, senza basarsi su singoli elementi di giudizio.

Il riconoscimento delle predazioni da parte dei carnivori si basa sui seguenti elementi:

Tracce e osservazioni nei dintorni del cadavere. Il luogo del ritrovamento fornisce già alcune importanti informazioni. Le aree aperte, lontane da boschi, possono indicare una predazione da parte di canidi; la lince preda prevalentemente in aree boscate, così come l'orso. Importanti sono inoltre le vocalizzazioni, percepibili nelle aree in cui si è riscontrato l'animale predato. Le tracce e impronte (rilevabili nei dintorni dell'animale predato, su terreno plastico quale fango o neve) sono inoltre tipiche di ogni specie, anche se eventuali confusioni sono possibili tra cani rinselvatichiti e lupo. Infine peli, penne, piume

ed escrementi possono essere un'importante indicazione, anche eventualmente con il ricorso ad analisi genetiche.

Segni sull'animale. Nel caso di un vero e proprio episodio di predazione, le ferite (da morsi e/o unghiate) riscontrate sull'animale sono accompagnate da emorragie sottocutanee e/o muscolari, caratteristiche queste assenti invece nel caso di necrofagia. La misurazione della distanza tra le perforazioni cutanee inflitte dai denti può fornire indicazioni per l'identificazione del predatore, così come la loro distribuzione sul corpo della preda. Il lupo e i canidi in generale cacciano in branco, infliggendo inizialmente estese ferite soprattutto agli arti posteriori e quindi uccidendo la preda per soffocamento con un morso alla gola; i canidi consumano volentieri i visceri (ad eccezione del contenuto dello stomaco), le cosce e il dorso delle prede. L'orso infligge alle prede numerose zampate al muso, al collo e sul dorso, consumando successivamente i visceri, la muscolatura e tralasciando pelle e ossa. La lince aggredisce le prede con un morso alla gola, (con conseguenti evidenti emorragie nella regione tracheale) e numerose graffiature ai fianchi, spalle e collo; consuma prevalentemente le parti muscolari, rivoltando la pelle in avanti verso la testa, e tralascia stomaco, intestino, pelle e testa.

In conclusione, nella valutazione degli episodi di predazione devono essere considerati più elementi contemporaneamente (sito di predazione, tracce specifiche, strategia di caccia, modalità di uccisione dell'animale, trattamento della carcassa), nonché la biologia dei predatori, al fine di poter emanare un giudizio più o meno certo sull'identità di specie del predatore.

Bibliografia: Molinari P., Breitenmoser U., Molinari-Jobin A., Giacometti M.: Predatori in azione. 2000.

ESPRESSIONE IMMUNOISTOCHIMICA DEI RECETTORI PER ESTROGENO E PROGESTERONE IN TESSUTI MAMMARI FELINI SANI, DISPLASTICI E NEOPLASTICI E SIGNIFICATO PROGNOSTICO NELLE FORME MALIGNHE

F. Millanta, M. Calandrella, S. Citi, A. Poli*

Dipartimento di Patologia Animale e * Dipartimento di Clinica Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria – Università di Pisa

Le neoplasie mammarie, frequenti nella gatta, costituiscono un interessante modello di studio. Nonostante le numerose indagini, rimane ancora da chiarire il ruolo svolto dai recettori per gli ormoni steroidei nella genesi di queste neoplasie. Lo scopo delle nostre indagini è stato valutare l'espressione immunoistochimica dei recettori per estrogeno (ER) e progesterone (PR) in tessuti mammary felini normali, displastici e neoplastici e determinarne il valore prognostico. Sono stati esaminati 87 campioni di tessuto mammary, 13 mammelle sane, 21 casi di displasia (8 adenosi, Ad; 5 iperplasie lobulari, IL; ed 8 ipertrofie mammary feline, IMF) e 53 carcinomi (6 "in situ" Cis; e 47 infiltranti, CI), prelevati da 70 gatte con un'età media di 9,6 anni. I CI sono stati successivamente suddivisi in base al grado di differenziazione. Le 47 gatte portatrici di CI sono state sottoposte ad un controllo post-operatorio di 2 anni. L'espressione di ER e PR è stata determinata, su sezioni di tessuto fissato in formalina ed incluso in paraffina, mediante anticorpi monoclonali diretti contro ER- α (Novocastra lab., UK) e PR (Biogenex, CA, USA) umani e streptavidina-perossidasi. La percentuale di positività è stata determinata contando i nuclei positivi su 1000 cellule ed i valori < 5% sono stati considerati negativi. Le variazioni tra i gruppi sono state valutate con il test di Bonferroni e la sopravvivenza, nelle gatte con i CI, con il test di Kaplan-Meier. Nel tessuto mammary sano l'espressione di ER è risultata maggiore rispetto alle IL ($P=0.002$), alle IMF ($P=0.004$), ai CIs ($P=0.072$) e ai CI ($P=0.000$), mentre non sono state osservate differenze con le Ad. PR era meno espresso nel tessuto sano (2/13 casi) e nelle Ad (2/8 casi), mentre era maggiormente presente nelle IL (5/5 casi), nell'IMF (8/8 casi) e nei CIs (6/6 casi). Nell'IMF PR era rilevabile anche nelle cellule stromali. Trenta dei 47 CI erano PR+, sebbene con valori più bassi rispetto ai CIs ($P=0.029$), in tre casi l'espressione di PR era associata all'espressione di ER, mentre 16 CI erano PR ed ER negativi. Nei CI l'espressione dei recettori non era influenzata né dall'istotipo ($P>0.05$) né dal grado di differenziazione ($P>0.05$) della neoplasia. La presenza o meno dei recettori non è risultata correlata con il decorso post-operatorio della malattia. In conclusione, le indagini condotte hanno evidenziato come nel tessuto sano risultino espressi sia ER che PR, con una prevalenza di ER. Questo pattern risulta ancora presente nelle Ad. Nelle forme di IL e nell'IMF si osserva un marcato aumento dell'espressione di PR che rimane ben espresso ancora nei CIs. Soltanto una parte dei CI perde la capacità di esprimere PR e la perdita di questi recettori non sembra essere associata ad una prognosi peggiore.

**RECETTORI PER ESTROGENI E PROGESTERONE
IN TUMORI MAMMARI DI CAGNA**

S. Pirino, E. Sanna, A. Leoni, A.M. Nieddu, E. Antuofermo, S. Rocca

Istituto di Patologia Generale, Anatomia Patologica e Clinica Ostetrico-Chirurgica. Veterinaria. Facoltà di Medicina Veterinaria. Università degli Studi di Sassari.

Con la presente indagine si è inteso: a) verificare l'applicabilità di alcuni monoclonali nell'immunolocalizzazione di recettori per estrogeni e progesterone; b) valutare l'espressione di tali recettori in differenti tipologie neoplastiche, anche in rapporto con il livello di positività del nuclear antigen (Mib-1). c) sottoporre i risultati a elaborazione statistica allo scopo di verificare la significatività delle medie di espressione e delle correlazioni. Sono stati utilizzati n. 31 tumori mammari di cagne di varie razze ed età, 24 dei quali carcinomi tubulo-papillari e 7 carcinomi solidi. Le sezioni sono state sottoposte, previo trattamento termico, a prove immunoistochimiche per la rivelazione di recettori per progesterone, estrogeni e Mib-1. Estrogeni: i carcinomi tubulo-papillari hanno manifestato una diffusa positività. Nel carcinoma solido è stata osservata una forte reazione sia negli epiteli che nello stroma. Progesterone: nei tumori tubulo-papillari è stata evidenziata una debole positività su poche cellule stromali ed epiteliali; sovrapponibili sono apparsi i quadri nei carcinomi solidi, seppure in un limitato numero di casi. Mib-1: la reazione è apparsa intensamente positiva. Dall'elaborazione delle medie sul totale dei casi, sono risultate percentuali di positività: per estrogeni, progesterone e Mib-1 rispettivamente del 70%, 49% e 40%. Scomponendo i dati per tipologia tumorale, i carcinomi tubulo-papillari hanno manifestato percentuali di positività del 70% per gli estrogeni, del 29% per il progesterone, del 34% per il Mib-1. I carcinomi solidi sono risultati positivi al 100% per gli estrogeni, al 62% per il progesterone, al 44% per il Mib-1. I tests statistici hanno dimostrato che gli scostamenti fra le diverse medie non erano significativi, considerati sia singolarmente che nell'incrocio dei dati ($p > 0,05$). La regressione lineare ha indicato la totale indipendenza dei caratteri presi in esame (valori inferiori a 0,5). I dati ottenuti sembrano dimostrare la sostanziale inesistenza di differenze nell'espressione dei recettori per estrogeni e per progesterone fra tumori di tipo tubulo-papillare e neoplasie più aggressive. I recettori per progesterone risultano più espressi nei tumori solidi rispetto alle varianti tubulo-papillari. Il Mib-1, dai nostri dati, non appare un attendibile testimone della malignità neoplastica. Sembrerebbe che i caratteri esaminati (recettori, Mib-1) seguano regole di progressione indipendente; tuttavia, deve essere sottolineato che essi non manifestano scostamenti significativi nel confronto fra tipologie neoplastiche. In definitiva, sembra emergere che i recettori esaminati e il Mib-1 non siano utilizzabili quali parametri di progressione e malignità e, conseguentemente, come indicatori prognostici. Tipi istologici aggressivi mostrerebbero sostanzialmente la conservazione del pattern recettoriale.

**CARATTERIZZAZIONE ISTOCHIMICA ED IMMUNOISTOCHIMICA
DEL CARCINOMA MUCOSO DELLA MAMMELLA DELLA CAGNA**

B. Brunetti, G. Sarli, P.S. Marcato, C. Benazzi

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

Il carcinoma mucoso della mammella della cagna viene descritto da Hampe e Misdorp (Bulletin WHO, 1974) come *“un carcinoma caratterizzato da un'eccessiva produzione di mucina, ...che potrebbe essere prodotta dalle cellule epiteliali, connettivali o mioepiteliali”*. Nella recente classificazione del WHO (1999) viene lasciato ampio spazio all'interpretazione istogenetica descrivendolo solo come un carcinoma con abbondante produzione di mucina.

Scopo del lavoro è stato di: 1) definire le caratteristiche istochimiche della componente mucopolisaccaridica dei carcinomi mucosi e di confrontarla con le caratteristiche istochimiche della matrice extracellulare dei nodi di proliferazione mioepiteliale dei tumori misti; 2) definire il profilo fenotipico delle cellule mucosecernenti dei carcinomi mucosi e confrontare i risultati con il profilo fenotipico delle cellule mioepiteliali dei nodi di proliferazione dei tumori misti. La casistica comprende 11 casi di carcinoma mucoso ottenuti in un arco di tempo di 14 anni (1987-2001) e confrontati con 10 casi di tumori misti. Per l'indagine istochimica sono state utilizzate le colorazioni PAS, PAS-diastrasi, Alcian a pH 2,5 e 1, Mucicarminio (MC) e Grimelius, mentre per l'immunoistochimica gli anticorpi anti-citocheratina 19 (CK 19), α -actina, -vimentina e -cromogranina A.

La mucina dei carcinomi mucosi è risultata alcianofila più a pH 2,5 che a pH 1 (carenza di mucopolisaccaridi acidi solforati) e MC positiva. Con la colorazione PAS e PAS-diastrasi solo 5 casi sono risultati positivi denotando un contenuto in mucopolisaccaridi neutri. Gli altri 6 casi, invece, erano negativi al PAS come risultava anche la matrice extracellulare dei nodi di proliferazione mioepiteliale dei tumori misti, che si rivelavano anche alcianofili sia a pH 2,5 che a pH 1 (ricchi di mucopolisaccaridi acidi solforati) e MC positivi. Il fenotipo delle cellule mucosecernenti dei carcinomi mucosi è risultato essere CK 19 positivo, α -actina e vimentina negativo in 5 casi su 11 (gli stessi casi PAS positivi diastrasi resistenti). Mentre le cellule degli altri 6 casi (quelli negativi al PAS) sono risultate CK 19 negative e α -actina e vimentina positive, analogamente alle cellule mioepiteliali dei tumori misti. Inoltre dei 5 casi di carcinoma mucoso PAS positivi/diastrasi resistenti 3 casi sono risultati positivi alla cromogranina A e al Grimelius suggerendo per questi un'origine neuroendocrina in analogia con la patologia umana.

In base ai risultati ottenuti solo 5 casi rimangono classificabili come carcinomi mucosi perché PAS positivi/diastrasi resistenti e positivi alla CK 19. Mentre gli altri 6 casi presentano un migliore inquadramento tra i tumori misti per la negatività al PAS e la positività all' α -actina e alla vimentina.

**STUDI PRELIMINARI DEL RECETTORE TIROSINA KINASICO MET NELLA
PATOGENESI DEL CARCINOMA MAMMARIO DEL GATTO**

R. De Maria¹, M. Castagnaro², B. Biolatti¹

¹ Dipartimento di Patologia Animale Sez. Anatomia Patologica Facoltà di Medicina Veterinaria di Torino

² Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Padova

Nel gatto i tumori mammari sono i tumori più frequenti dopo quelli che colpiscono la pelle e il sistema ematopoietico, rappresentando circa il 10% di tutti i casi. Dal punto di vista anatomico patologico il tumore mammario del gatto presenta evidenti similarità con il tumore mammario *ormone indipendente* che colpisce la donna e può perciò essere considerato un buon modello sperimentale nell'oncologia comparata. Nel gatto la maggior parte degli studi relativi a meccanismi patogenetici ha preso in considerazione soprattutto fattori virali e ormonali mentre la possibilità del ruolo degli oncogeni non è stata ancora esaminata. Tra le diverse proteine recettoriali studiate in campo umano, i recettori per i fattori di crescita con attività tirosina chinasi sembrano avere un potenziale oncogenico in diverse patologie neoplastiche umane e animali e in particolare i recettori che fanno parte della famiglia di MET. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare l'espressione del recettore MET (il cui ligando specifico è HGF) nel gatto e in particolare nella patogenesi del carcinoma mammario. I materiali e metodi utilizzati sono stati i seguenti: estrazione di RNA da tessuti di riferimento (polmone, milza, cellule di carcinoma mammario di gatto) retrotrascrizione in cDNA, PCR, sequenziamento di acidi nucleici, Western-blot. Dall'amplificazione con oligo degenerati costruiti sulle regioni corrispondenti al dominio catalitico del recettore è stata sequenziata la regione di cDNA compresa tra gli esoni 18 e 21 del recettore. Per quanto riguarda invece lo studio della proteina, è stata caratterizzata attraverso western blot e immunoblot nelle cellule p248 (linea cellulare proveniente da carcinoma mammario di gatto). Dai risultati ottenuti è possibile innanzitutto affermare che anche il gatto esprime la proteina MET con un peso di circa 135 KDa. Per quanto riguarda invece la sequenza nucleotidica a livello di cDNA è stato visto che sussiste un'omologia del 93% con quella umana e che gli aminoacidi Tyr 1234 e Tyr 1235 responsabili della fosforilazione del recettore sono altamente conservati.

ADENOCARCINOMA MAMMARIO IN DUE TOPI DA COMPAGNIA

S. Iussich*, M. Tursi*, E. Scanziani**

* Università degli Studi di Torino

**Università degli Studi di Milano

Negli ultimi anni il topo, presente in natura allo stato selvatico e largamente utilizzato come animale da esperimento, è diventato un vero e proprio animale "da compagnia". Il topo rappresenta un ottimo modello per lo studio dei tumori mammari in patologia comparata, sia per la somiglianza con l'uomo della struttura e dello sviluppo mammario, sia perché la maggior parte degli adenocarcinomi mammari murini, che presentano pattern simili a quelli umani, risulta essere virus-indotta, quindi meglio caratterizzata sul piano patogenetico ed utilizzabile in transgenesi. In questo lavoro sono stati studiati 2 topi da compagnia, incroci, femmine che presentavano voluminose masse a livello mammario. Istologicamente i tumori sono risultati adenocarcinomi di tipo A (pattern tubulare con acini piccoli e ben differenziati), con metastasi multiple al polmone e, in un caso, alla valvola tricuspide cardiaca. Malgrado lo studio completo della massa tumorale attraverso diverse sezioni non sono state ritrovate metastasi ai linfonodi regionali. Tale reperto meriterebbe ulteriori approfondimenti considerato che in medicina umana i linfonodi regionali sono il primo sito di metastasi, mentre in letteratura vi è una sola segnalazione di metastasi linfonodali nel topo (Corbett 1978). La possibilità di poter studiare questi topi apre una nuova possibilità di studio dei fattori di rischio e dei fattori ambientali, comuni al topo e all'uomo, implicati nello sviluppo delle neoplasie mammarie.

LOCALIZZAZIONE DI SEQUENZE RETROVIRALI TIPO-D IN NEOPLASIE MAMMARIE DI CAGNA E DI GATTA. INDAGINI PRELIMINARI

E. Sanna, M.P. Sanna, A. Leoni, S. Pirino, S. Farigu

Istituto di Patologia Generale, Anatomia Patologica e Clinica Ostetrico-Chirurgica Veterinaria, Facoltà di Veterinaria, Università di Sassari.

Il retrovirus tipo-D denominato Jaagsiekte Sheep Retrovirus è l'agente eziologico accertato del Carcinoma Polmonare dell' ovino e del muflone (OPC), (Palmarini *et al.*, 1999; Sanna *et al.*, 2001) ma suoi antigeni capsidici risultano espressi anche da alcuni carcinomi bronchiolo-alveolari dell'uomo (BACs) (De Las Heras *et al.*, 2000). La specifica associazione di retrovirus con neoplasie mammarie della gatta e della cagna è stata in passato sospettata sulla base di evidenze elettro-microscopiche e colturali (Weijer *et al.* 1974; Watrach *et al.*, 1978; Neurkar *et al.*, 1989; Hellmen, 1992). Allo scopo di verificare la presenza di sequenze retrovirali JSRV-like in carcinomi mammari di cagna e di gatta, abbiamo sottoposto a tests di PCR in fase liquida e di ibridazione in situ (ISH), specifici per la rivelazione di sequenze appartenenti al tratto U3-LTR del DNA provirale di JSRV (Palmarini *et al.*, 1996; Sanna *et al.*, 2001), i seguenti tessuti d'archivio: n. 4 carcinomi mammari di cagna (3 di tipo solido, 1 di tipo tubulo-papillare), n. 9 casi di carcinoma mammario di gatta (3 di tipo solido, 6 di tipo tubulo-papillare), n. 2 campioni di tessuto mammario normale (2 di cagna e 2 di gatta), un campione di OPC ovino e un campione di rene di coniglio. Le procedure in fase liquida hanno consentito di evidenziare bande di peso molecolare diverso da quello atteso in un caso di carcinoma mammario di cagna, uno di gatta e in un campione di tessuto mammario normale di cagna, mentre i tests di ISH hanno consentito di rilevare segnali attendibili in sette casi e precisamente: cinque di gatta (neoplasie di tipo solido e tubulo-papillare un campione di tessuto mammario normale), uno di cagna (in un carcinoma solido) e, ovviamente, in un controllo positivo (OPC di ovino). I campioni di rene di coniglio hanno fornito risultati negativi. Le sezioni di carcinoma mammario di gatta e di cagna hanno manifestato marcature sia in sede intranucleare che, seppure in minor misura, nel citoplasma degli elementi neoplastici mentre, per quanto riguarda l'unico campione positivo di tessuto mammario normale, esso ha sviluppato segnali in corrispondenza degli epiteli duttali; il comparto tubulo-alveolare è risultato invece negativo. Appare ora necessario: 1) sequenziare gli ampliconi ottenuti, verificare l'attività trascrittiva delle sequenze rilevate e soprattutto la specificità dell'associazione con le predette neoplasie.

Bibliografia

De Las Heras *et al.*, 2000. Eur Respir J,16:330-2. Hellmen, 1992. In Vitro Cell Dev Biol, 28A(5):309-19. Neurkar *et al.*, 1989. J Comp Pathol,101(4):389-97. Palmarini *et al.*, 1996. J Virol, 70:1618-23. Palmarini *et al.*, 1999. J Virol, 73:6964-72. Sanna *et al.*, 2001. J Comp Pathol, 125:145-52. Watrach *et al.*, 1978. Br J Cancer, 38(5):639-42 Weijer *et al.* 1974. J Natl Cancer Inst, 52(3):673-9.

Congresso Nazionale

“Aggiornamenti in Patologia Veterinaria”

Fossano (CN) 24-25 Maggio 2002

**STUDIO IMMUNOISTOCHEMICO DELL'ANGIOGENESI
NEL SARCOMA INIEZIONE-INDOTTO DEL GATTO**

V. Grieco, R. Bergottini, D. Stefanello, D. Fonda, M. Mottadelli, G. Mandelli

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

Sempre più frequentemente si segnalano, nel gatto, sarcomi localizzati nelle sedi d'inoculazione di vaccini o farmaci. Tali neoplasie, pur dotate di una notevole aggressività locale e di una frequente tendenza alla recidiva, metastatizzano raramente. Tipica del sarcoma iniezione-indotto è un'area centrale di necrosi, che si osserva anche in neoplasie di piccole dimensioni. L'angiogenesi rappresenta uno dei campi più moderni di studio oncologico. Secondo la teoria di Folkman ad un'elevata angiogenesi corrisponderebbe un maggior rischio di metastasi. Quanto esposto sembra essere applicabile con certezza alle neoplasie epiteliali, mentre sono assai pochi gli studi riguardanti quelle mesenchimali. La costante necrosi e la scarsa tendenza a metastatizzare tipica del sarcoma iniezione-indotto del gatto potrebbero attribuirsi ad una relativa scarsità di vasi posseduta da questo tipo di neoplasia. Nel presente studio tale ipotesi viene considerata e verificata. Dall'archivio della nostra Sezione sono stati selezionati 39 sarcomi felini iniezione-indotti. Dai blocchetti in paraffina, sono state ottenute sezioni, colorate con Ematossilina-Eosina per l'esame istologico ed il calcolo dell'indice mitotico (IM), e sezioni da destinare a test immunocistochimici in cui si sono impiegati anticorpi diretti contro actina muscolare liscia e Fattore VIII per evidenziare rispettivamente parete ed endotelio vascolare. La conta dei vasi è stata effettuata sulle sezioni marcate con Fattore VIII considerando, per ciascuna neoplasia, 4 campi random a 250X. Dei valori così ottenuti si sono poi calcolate media e deviazione standard (DS). I tumori erano così ripartiti: 34 fibrosarcomi, 2 sarcomi polimorfi e 3 istiocitomi fibrosi maligni. L'IM variava tra 0 e 6, ma la maggioranza dei campioni era compresa nel range 0-1,5. Per ciò che riguarda i valori medi di vascolarizzazione per caso esaminato, essi variavano da 3 a 30, tuttavia, la più parte di essi mostrava valori compresi tra 3 e 15 ed il 74% dei casi possedeva valori di DS compresi tra 0,5 e 3. Non è stata osservata alcuna correlazione tra attività angiogenetica ed indice mitotico, anzi in alcuni casi tali valori parevano tra loro totalmente dissociati. Da un punto di vista morfologico poi, le pareti muscolari dei vasi neoformati presentavano frequentemente variazioni di spessore e tratti interrotti. A livello endoteliale, le cellule apparivano spesso rigonfie e con nuclei ben riconoscibili. I risultati ottenuti dimostrano che l'angiogenesi nel sarcoma iniezione-indotto del gatto, pur variando da caso a caso, sembra essere abbastanza contenuta. Pertanto, le estese aree necrotiche centrali tipiche della neoplasia potrebbero essere il risultato di una crescita neoplastica veloce non accompagnata da un'adeguata angiogenesi di supporto. Inoltre, l'angiogenesi relativamente contenuta potrebbe contribuire a spiegare la scarsa tendenza alla metastatizzazione tipica di queste neoplasie.

Congresso Nazionale

“Aggiornamenti in Patologia Veterinaria”

Fossano (CN) 24-25 Maggio 2002

**VALUTAZIONE DELL'INDICE DI APOPTOSI E DI PROLIFERAZIONE
CELLULARE NELLE LESIONI PRENEOPLASTICHE E NEL CARCINOMA
SQUAMOSO DEL GATTO**

F. Abramo, A.M. Cucco, F. Millanta, A. Poli

Dipartimento di Patologia Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria di Pisa

E' stato condotto uno studio retrospettivo su 17 carcinomi squamosi insorti su pinne di gatti bianchi. Questa sede è ben nota al clinico dermatologo per essere suscettibile di alterazioni sostenute dall'azione dei raggi solari. Ogni prelievo è stato eseguito in modo tale da comprendere sia cute normale che lesioni riferibili a cheratosi attinica e carcinoma squamoso. Per ogni campione sono stati valutati l'indice di apoptosi (IA) e di proliferazione cellulare (IP) in aree di cute normale, in zone con alterazioni di tipo preneoplastico e neoplastico. Le lesioni preneoplastiche sono state classificate, in base alle caratteristiche istologiche, in neoplasia intrepiteliale cheratinocitica di grado I, II e III, utilizzando lo schema proposto in medicina umana. Il carcinoma squamoso è stato classificato secondo i criteri proposti dal WHO. Per l'evidenziazione delle cellule apoptotiche è stato utilizzato il kit ApopTag Plus: l'IA è stato determinato contando il numero di cellule apoptotiche su 1000 cellule tumorali, nelle aree di carcinoma squamoso, e su 1000 cheratinociti nelle aree di cheratosi attinica e cute normale. Il numero ottenuto è stato espresso come percentuale di cellule apoptotiche. Per la determinazione dell'IP è stato utilizzato l'anticorpo monoclonale MIB-1 contro la proteina nucleare Ki-67, analogamente a quello di apoptosi. L'IA è aumentato parallelamente al grado di malignità delle lesioni risultando pari a $0,01\pm 0,03$ nella cute normale, $0,2\pm 0,1$ nella neoplasia intrepiteliale cheratinocitica e $1,2\pm 1$ nel carcinoma squamoso: data la fugacità del fenomeno di apoptosi, il riscontro di bassi valori è comunque indice di significativa perdita cellulare nelle aree considerate. Analogamente all'IA è stato riscontrato un progressivo aumento dei valori dell'IP: pari a $8,1\pm 6,9$ nelle aree di cute normale, $30\pm 9,7$ nelle aree di neoplasia intrepiteliale cheratinocitica e $42\pm 19,6$ nel carcinoma squamoso. L'aumento dell'IA, se pur da considerare un fenomeno paradossale, è già stato segnalato in medicina umana in carcinomi squamosi indifferenziati e potrebbe rappresentare un meccanismo di difesa dell'organismo stimolato dal progressivo accumulo di aberrazioni genomiche da parte del tumore. Tale fenomeno paradossale viene anche spiegato in base alle teorie proposte per la cancerogenesi attinica, in quanto l'aumento della proliferazione cellulare avverrebbe proprio in corrispondenza di focolai di apoptosi.

**ADENOMA ORBITALE DELLA GHIANDOLA ZIGOMATICA IN UN CANE :
CARATTERISTICHE ISTOLOGICHE ED IMMUNOISTOCHEMICHE**

*C. Giudice**, *M. Rondena**, *M.Radice°*, *L. Mertel°*, *G. Cammarata**

*Sezione di Anat. Patol. Veterinaria e Pat. Aviare, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli studi di Milano. ° Medico Veterinario, Libero Professionista, Milano.

Questo lavoro fornisce un contributo alla diagnosi differenziale tra adenoma delle ghiandole zigomatica e lacrimale. Entrambe le ghiandole sono situate in prossimità del cavo orbitale, possono sviluppare neoplasie che invadono l'orbita ed hanno caratteristiche morfologiche molto simili. Tumori delle ghiandole zigomatica e lacrimale sono stati raramente segnalati nel cane, con una netta prevalenza di neoplasie maligne (adenocarcinomi). La presente indagine ha avuto per oggetto una neoformazione infraorbitale, con esoftalmo e prolasso della terza palpebra, rilevata in un cane, schnauzer standard, femmina, di 13 anni. Piccoli frammenti bioptici della massa, esaminati istologicamente, rivelavano una neoplasia epiteliale composta da cellule da cuboidali a prismatiche, per lo più formanti adenomeri, con ampio citoplasma eosinofilo e nuclei rotondi eterocromatici. Le cellule neoplastiche non presentavano segni di atipia né attività mitotica. Veniva quindi formulata la diagnosi di adenoma orbitale che poteva originare tanto dalla ghiandola lacrimale quanto dalla zigomatica. La massa, asportata chirurgicamente tramite orbitotomia laterale, misurava 5x3x2 cm. L'intero campione è stato fissato in formalina. L'esame di numerose sezioni della neoplasia ha evidenziato aspetti di adenoma per lo più sovrapponibili a quelli dei campioni bioptici. Una sola sezione comprendeva un piccolo lobulo ghiandolare caratterizzato da cellule con citoplasma chiaro finemente vacuolizzato e nucleo basale ed appariva del tutto simile ad una piccola porzione della ghiandola di origine della neoplasia, in normale attività secretoria. Indagini istochimiche ed immunoistochimiche sono state condotte sul tumore e, comparativamente, su campioni di ghiandole zigomatiche e lacrimali normali. La porzione del tumore in attività secernente dimostrava spiccata positività per Alcian blu a pH 1, affinità tintoriale che identificava la presenza di mucopolisaccaridi solfati nel suo secreto e consentiva pertanto di escludere una sua origine lacrimale. Le indagini immunoistochimiche (CK AE1/AE3 e CK 8/18 +; vim ed alpha actina -) non si rivelavano invece utili nel discriminare l'origine della neoplasia. Le cellule neoplastiche evidenziavano una aumentata espressione di citocheratine, rilevabile invece solo debolmente e focalmente nella ghiandola zigomatica normale (emilune sierose). L'intensa reattività per citocheratine era correlabile alla perdita dell'attività secretiva da parte delle cellule neoplastiche, con conseguente difficoltà di identificazione della loro origine, dato che proprio sulle caratteristiche secretive può basarsi un criterio discriminativo. La diagnosi differenziale tra adenoma della ghiandola zigomatica e lacrimale deve pertanto basarsi sulla ricerca di porzioni normali e funzionanti della ghiandola colpita da neoplasia.

VALUTAZIONE DELLA NEOANGIOGENESI NEI PROCESSI PROLIFERATIVI E NEOPLASTICI DELLE GHIANDOLE PERIANALI DEL CANE

F. Rosone, M. Marà, G. Marruchella, G. Di Guardo, L. Della Salda

Università degli Studi di Teramo- Facoltà di Medicina Veterinaria – Dipartimento di Strutture , Funzioni e Patologie degli Animali e Biotecnologie

L'angiogenesi è il processo biologico che porta alla formazione di nuovi vasi a partire da un letto vascolare preesistente. E' particolarmente rappresentata in numerose affezioni, sebbene la sua espressione più intensa sia quella che accompagna la crescita tumorale. Sono state da noi prese in esame 9 iperplasie e 23 neoplasie, che sono state rispettivamente classificate in "Iperplasia", "Adenoma", "Epitelioma" ed "Adenocarcinoma" delle ghiandole perianali. E' stata applicata una metodica immunoistochimica nei confronti del fattore VIII-b (fattore di von Willebrand, vWF), componente intrinseco delle cellule endoteliali. E' stato utilizzato un Ab policlonale anti-vWF, impiegato ad una diluizione finale di 1:800. I principali obiettivi del lavoro sono stati: 1)-verificare l'esistenza di eventuali correlazioni fra gli istotipi tumorali ed il loro grado di vascolarizzazione; 2)-valutare l'eventuale esistenza, nell'epitelioma, di indici di vascolarizzazione compatibili con un'evoluzione in senso maligno della neoplasia.

La valutazione del grado di vascolarizzazione, effettuata con un sistema di analisi computerizzata, ci ha consentito di rilevare i cosiddetti "hot spots", ovvero le aree del tumore caratterizzate da una maggiore densità vascolare, sulle quali è stata effettuata la conta dei vasi. I valori così ottenuti sono stati sommati e rapportati all'unità di 1 mm². L'indagine statistica (test di Spearman) ha fornito i seguenti risultati: iperplasie, da 3388,03 (val.min) a 4630,32 (val.max) microvasi/mm² (media= 4141,93, dev.std=573,08, err.std=191,02); adenomi, da 1468,15 a 4856,18 microvasi/mm² (media= 2730,96, dev.std=661,73, err.std=326,89); epiteliomi, da 3388,03 a 4630,32 (media=4140,93, dev.std=661,73, err.std=382,053); adenocarcinomi, da 2823,36 a 4856,18 (media=3739,39, dev.std= 728,50, err.std=242,83). L'indagine statistica non ha dimostrato differenze significative nel numero di vasi fra gli istotipi tumorali in esame, ad eccezione di quelle emerse nel confronto fra adenomi ed adenocarcinomi, in cui la densità dei microvasi appariva statisticamente più elevata rispetto ai primi. L'apparente riduzione del numero di microvasi procedendo dalle iperplasie/epiteliomi verso gli adenomi, per poi accrescersi nuovamente, potrebbe essere giustificata, almeno in parte, dalla minore densità della matrice stromale e, con essa, dei microvasi, come si verifica generalmente in corso di adenoma. Di interesse ci è sembrato, il dato relativo all'epitelioma, visto che la neoangiogenesi non sembrerebbe correlare, in questa forma neoplastica, con altri parametri biologici suggestivi di una trasformazione in senso maligno. E' nostra intenzione "rivisitare" la casistica in oggetto attraverso lo studio di più precoci "markers" di neoangiogenesi (CD31), associando lo studio di altri parametri di comportamento biologico della neoplasia.

**MASTOCITOMA INTESTINALE IN UN GATTO:
CARATTERIZZAZIONE IMMUNOISTOCHEMICA ED ULTRAISTRUTTURALE**

M. Marà, F. Rosone, G. Marruchella, G. Di Guardo, L. Della Salda

Università degli Studi di Teramo - Facoltà di Medicina Veterinaria
Dipartimento di Strutture, Funzioni e Patologie degli Animali e Biotecnologie

Il mastocitoma intestinale (MI) è un raro tumore del gatto ad eziologia ignota, la cui diagnosi è non del tutto agevole. Descriviamo qui un caso di MI in un gatto europeo, maschio, di 11 anni, FIV+ e FeLV -. Macroscopicamente la neoformazione, d'aspetto lardaceo, avvolgeva un tratto di digiuno asportato insieme ad essa. Il fegato mostrava un nodulo di circa 2 mm, lasciato in sede. Sui campioni, oltre alle routinarie tecniche istologiche, sono state eseguite le seguenti colorazioni: blu di toluidina, Giemsa, PAS (con e senza diastasi), PTAH, Masson, Luxol-fast-blue e Grimelius. Sugli stessi sono stati saggiati MoAbs nei confronti di: actina (SMA), calponina, vimentina, enolasi neuronospecifica (NSE) e fattore VIII-b (vWF). Sono state allestite sezioni per indagini al T.E.M.

Il tumore presentava una struttura mista, a "vortici" ed a "cordoni", essendo caratterizzato da cellule poligonali e fusate frammiste ad altre, eosinofile, immerse in una più o meno delicata matrice stromale. Dalla tonaca muscolare, diffusamente colonizzata dalla neoplasia, gli elementi tumorali invadevano la sottomucosa e, per ampi tratti, anche la *muscularis mucosae* e la mucosa intestinale. Il citoplasma appariva spesso vescicoloso, i nuclei centrali o eccentrici, mentre le cellule eosinofile mostravano spesso nuclei doppi o tripli. Istochimicamente, il tumore era: blu di toluidina: +/-; Giemsa: +/-; PAS (con e senza diastasi): +; Luxol-fast-blue: -; PTAH -; Grimelius: -. Immunohistochimicamente, il "pattern" era il seguente: SMA: -; Calponina: -; Vimentina: +; VWF: -; NSE: -. Ultrastrutturalmente, le cellule tumorali mostravano numerose vescicole citoplasmatiche, talvolta coalescenti, al cui interno si rinvenivano occasionali granuli e fine materiale fibrillare. Cellule con nuclei bilobati e citoplasma con caratteristici granuli elettrondensi (granulociti eosinofili) si osservavano tutt'intorno. I dati morfologici ci hanno consentito di formulare la diagnosi di MI. E' emersa la necessità di un adeguato protocollo di indagini clinico-laboratoristiche, fondamentale per un corretto inquadramento diagnostico del MI che condivide aspetti morfologici con altri tumori intestinali ed extra-intestinali (carcinoidi ed emangiopericitomi, questi ultimi peraltro mai descritti in tale specie). Di ausilio diagnostico possono risultare l'effettuazione di impronte a fresco del MI, o l'impiego di altri fissativi, quali il Carnoy. D'interesse è la biologia del mastocita intestinale, cellula con caratteristiche biochimico-funzionali diverse rispetto ai c.d. "mastociti connettivali". A riprova di ciò, vi sono l'assenza di sindromi paraneoplastiche in corso di MI, ed i reperti di neoangiogenesi capillaro-vasale, fibroplasia e collagenolisi osservati. Un aspetto degno di approfondimento attiene agli eventuali rapporti causali tra infezione da FIV ed insorgenza di MI nel gatto in esame.

UN CASO DI OSTEOSARCOMA A PICCOLE CELLULE IN UN CANE

S. Ferro, M. Castagnaro, L. Cavicchioli

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

L'Osteosarcoma a Piccole Cellule è un raro sottotipo di osteosarcoma identificato come entità istologica riproducibile per la prima volta nell'uomo da Sim nel 1979. Nel cane ne è stato descritto un unico caso negli Stati Uniti nel 1991 da Frazier in un San Bernardo di 5 anni nella sede di un'ulnectomia.

Questo tumore è una rara variante di Osteosarcoma intramidollare di grado elevato, per definizione caratterizzato dalla produzione di matrice osteoide. Le cellule possiedono una tipica traslocazione cromosomica in posizione t(11;22). Il quadro clinico è rappresentato da dolore, rigonfiamento in assenza di lesioni preesistenti. Il 70% dei soggetti colpiti dalla patologia ha meno di 20 anni. La sede d'elezione è costituita dalle metafisi delle ossa lunghe e dal bacino, con lieve predilezione per i soggetti di sesso femminile. Il quadro istopatologico è caratterizzato dalla presenza di piccole cellule rotonde o fusate, distribuite a tappeto o in cordoni, con la presenza di quantità variabili di osteoide che può essere diffusa o multifocale. In un terzo dei casi è presente metaplasia cartilaginea. È possibile avere un quadro focale tipo emangiopericitoma. La necrosi può essere presente ma non è mai massiva. Le mitosi sono rare o scarse. Il trattamento prevede il protocollo dell'Osteosarcoma. Talvolta la diagnosi risulta problematica se si analizza un campione bioptico nel quale non sia presente osteoide. Dal momento che non esiste un profilo immunistochimico specifico per l'Osteosarcoma a Piccole cellule, la diagnosi immunistochimica rappresenta una diagnosi di esclusione.

Il caso da noi trattato riguarda un cane di razza Boxer, femmina di 6 anni, con una tumefazione ossea interessante la porzione distale di radio-ulna. Il quadro istologico era caratterizzato dalla presenza di cellule discrete rotondeggianti distribuite a tappeto o in cordoni cellulari con depositi multifocali di matrice osteoide in quantità moderata. Le colorazioni speciali effettuate (PAS-PAS Diastasi; impregnazione argentea e Van Gieson) hanno messo in evidenza la presenza di minime quantità di glucosio citoplasmatico e l'assenza di reticolina. Il campione ha rivelato una lieve positività alla vimentina e negatività a desmina e citocheratine. Questo secondo caso di Osteosarcoma a Piccole Cellule suggerisce l'esistenza di tale patologia anche nel cane. I pochi dati disponibili non permettono di affermare se si tratti di una patologia eccezionale nel cane oppure rara e di conseguenza non ancora conosciuta. In ogni caso il Patologo Veterinario dovrà essere in grado di riconoscerla, attingendo eventualmente alle conoscenze della letteratura anatomopatologica umana.

AFLATOSSICOSI INDOTTA IN SCROFE GRAVIDE: INDAGINI EMATOCHIMICHE E RISPOSTA CELLULO-MEDIATA NEI SUINETTI

¹F.Miduri, ²N.Losio, ³L.Bonati, ⁴A.Fusari., ¹P.Borghetti, ¹A.M.Cantoni, ¹A.Corradi, ¹E.Cabassi

¹Dipartimento di Salute Animale - Sezione di Patologia Generale ed Anatomia Patologica Veterinaria, Parma.

²Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia.

³Dipartimento di Salute Animale - Sezione di Clinica Medica Veterinaria.

⁴Dipartimento di Salute Animale - Sezione di Tossicologia Veterinaria.

Tra le micotossine più pericolose per la salute umana ed animale si annoverano le aflatossine B (B1, B2, M1, M2) e G (G1, G2) che derivano dal metabolismo secondario di miceti del genere *Aspergillus* (*A. var. flavus* e *var. parasiticus*). Il suino denuncia una particolare sensibilità a questo tipo di intossicazione manifestando variazioni morfologiche (epatiche e renali), ematochimiche, alterazioni della funzionalità del sistema immunitario (umorale e cellulo-mediato) e delle performances produttive/riproduttive. L'obiettivo del presente studio è quello di indagare il comportamento biochimico-clinico di alcuni parametri ematici contestualmente alla valutazione della ripartizione immunofenotipica delle sottopopolazioni linfocitarie T (CD4⁺ e CD8⁺) in suinetti nati da scrofe alimentate giornalmente con una dieta contenente un pool di aflatossine durante il periodo di gestazione e lattazione. Il protocollo sperimentale ha previsto l'utilizzo di sei scrofe pluripare, clinicamente sane, delle quali 2 hanno rappresentato il gruppo di controllo e le restanti 4 hanno costituito il gruppo trattato e sono state alimentate giornalmente (dal 40° giorno di gestazione al 22° giorno di lattazione) con un mangime contenente un pool di aflatossine (B1, B2, G1, G2), pari a 300ppb. I prelievi ematici sono stati effettuati in 4 suinetti maschi/scrofa al 3° e 20° giorno di età, per indagini emocromo-citometriche, biochimico-cliniche (metabolismo dell'azoto, energetico, minerale, costanti enzimatiche di funzionalità d'organo) e per la valutazione della ripartizione immunofenotipica delle principali sottopopolazioni linfocitarie T (CD4⁺ e CD8⁺). I risultati ottenuti dall'analisi dei parametri emocromocitometrici e biochimico-clinici non hanno evidenziato differenze statisticamente significative, pur nell'ambito delle oscillazioni individuali, tra i suinetti nati da scrofe controllo e quelli nati da scrofe esposte all'intossicazione. L'analisi citofluorimetrica delle sottopopolazioni linfocitarie T non ha evidenziato differenze significative nell'espressione dei markers superficiali (CD4⁺ e CD8⁺) nei soggetti di 3 giorni di vita, mentre in quelli di 20 giorni indirettamente esposti all'intossicazione, ha rivelato una significativa diminuzione degli stessi markers rispetto ai soggetti controllo della medesima età. Questa alterata ripartizione delle sottopopolazioni linfocitarie potrebbe trovare spiegazione nella presenza dei metaboliti tossici M1, M2 e B1 nel latte delle scrofe intossicate che verrebbe assunto dai suinetti durante il periodo di allattamento.

CARATTERIZZAZIONE E CONFRONTO DEGLI ASPETTI CLINICI E NEUROPATOLOGICI IN UN FOCOLAIO ITALIANO DI SCRAPIE

L. Dagani^o, C. Casalone, C. Florio, P.L. Acutis, M.I. Crescio, A. D'Angelo, M. Caramelli, E. Scanziani^o.*

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

^oUniversità degli studi di Milano, Dipartimento di Anatomia Patologica e Patologia Aviaria

*Università di Torino, Dipartimento di Patologia Animale

La Scrapie è una malattia neurodegenerativa della pecora e della capra, archetipo del gruppo delle Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili (EST). Il rischio che la BSE circoli nelle greggi ovine, determinando una patologia clinicamente indistinguibile dalla scrapie, ma che può rappresentare un pericolo per l'uomo, ci ha indotti a studiare un focolaio di Scrapie situato in provincia di PG e costituito da ovini di razza Comisana, al fine di evidenziare le caratteristiche clinico-patologiche dei casi.

Dei 54 campioni esaminati, 11 sono risultati positivi (prevalenza pari al 20,37%) con metodica istologica, immunoistochimica e western-blot e di questi solo tre manifestavano una sintomatologia all'esame clinico. Di questi uno presentava sintomatologia lieve, uno moderata e uno grave. Il sangue dei tre sintomatici, sottoposto ad esame con la PCR, ha rilevato il genotipo:AA136RR154QQ171 che risulta essere quello maggiormente suscettibile alla malattia.

Le sezioni seriate ottenute a livello di telencefalo, diencefalo, mesencefalo, ponte e cervelletto e midollo allungato dagli encefali dei tre sintomatici sono state sottoposte a colorazione con Ematossilina Eosina per ottenere il profilo istolesivo ed a Immunoistochimica per PrPsc e per GFAP per studiare sia la distribuzione che il pattern della PrPsc sia l'iperplasia/ipertrofia degli astrociti. L'esame istopatologico del SNC dei tre ovini ha permesso di rilevare un quadro neurodegenerativo caratterizzato da spongiosi del neuropilo e vacuolizzazione dei neuroni. Il profilo istolesivo è apparso sostanzialmente omogeneo in tutti e tre gli ovini ma con una intensità della spongiosi differente a seconda del grado di sintomatologia neurologica.

La reazione immunoistochimica per l'evidenziazione della PrPsc ha mostrato una positività diffusa in tutti i distretti encefalici considerati ma, anche in questo caso, con una intensità diversa sovrapponibile alla gravità della sintomatologia. L'immunolocalizzazione si presenta sotto forma di depositi puntiformi, distribuzione a "cielo stellato" e positività perivascolare; in alcuni vasi la PrPsc si deposita sotto forma di accumuli. La reazione immunoistochimica per la GFAP ha permesso di osservare una marcata astrocitosi di eguale intensità in tutti e tre i casi; la reazione risulta essere più intensa nelle aree più craniali dell'encefalo rispetto alle caudali. Non esiste inoltre una correlazione tra astrocitosi, spongiosi e distribuzione della PrPsc.

**CARATTERISTICHE CLINICO-PATOLOGICHE DELLA NECROSI DEL CORNO
DI AMMONE NEL GATTO. PRIMA SEGNALAZIONE IN ITALIA**

M.I. Crescio, C. Casalone, E. Bozzetta, G. Gandini, G. Ghidella §,
R. Fatzer §§, M. Caramelli*

C.E.A. Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta

* Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Bologna

§ Libero Professionista, Alessandria

§§ Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Berna

La Necrosi del Corno di Ammone è una rara patologia del gatto caratterizzata da lesioni neuropatologiche simmetriche e bilaterali di natura prevalentemente degenerativa, segnalata soltanto in Svizzera. Questo lavoro costituisce la prima segnalazione in Italia. L'eziologia della malattia è ignota, benchè si sospetti che siano implicati fattori tossico metabolici. Non sono note predisposizioni di razza, età o sesso. I casi sono accomunati da sintomatologia neurologica a rapida insorgenza con alterazioni del comportamento e comparsa di convulsioni che da manifestazione acuta portano all'instaurarsi di uno "status epilepticus". La visita clinica e le indagini collaterali sono utili ad emettere una diagnosi presuntiva sulla sede delle lesioni, ma soltanto l'esame istologico del Sistema Nervoso Centrale permette una diagnosi definitiva. Sono stati studiati due gatti meticci: un maschio di 7 anni ed una femmina di 6 anni che avevano manifestato alterazioni del comportamento. Gli animali sono stati sottoposti ad esame clinico ed alle relative indagini collaterali. Dopo eutanasia sono stati eseguiti sul SNC l'esame istologico con colorazione ematossilina-eosina, l'esame immunoistochimico per la proteina fibrillare acida (GFAP) e l'esame immunoistochimico per il rilievo della PrP_{sc} per escludere la presenza di Encefalopatia Spongiforme Felina. In un caso, in cui la presenza di infiltrati linfocitocitari a sede perivascolare a livello di Corno di Ammone potevano fare sospettare la malattia di Borna è stata eseguita la ricerca dell'agente infettivo tramite PCR. Il primo gatto presentava alternanza di momenti di disorientamento ed atteggiamenti normali, diminuita risposta alla minaccia bilaterale, attività convulsivante di tipo parziale-complesso. Nel secondo caso per la marcata aggressività del soggetto non è stato effettuato l'EOP sul SNC; la sintomatologia è durata alcuni mesi. In entrambi i casi l'esame neuropatologico ha messo in evidenza lesioni localizzate a livello del Corno di Ammone e del Lobo Piriforme. Si sono riscontrati quadri caratterizzati da: perdita neuronale e presenza di cellule "sofferenti" con pericari coartati a livello di strato delle cellule piramidali. A livello di strato molecolare si sono rilevati marcati aspetti di astrocitosi ed astrogliosi, formazione di cellule fibrillari, riferibili ad uno stadio ormai cronico con fenomeni di cicatrizzazione. E' stata rinvenuta, inoltre, proliferazione dei capillari e, solamente in uno dei due casi, formazione di manicotti perivascolari di natura linfocitocitaria. L'esame immunoistochimico per la GFAP ha messo in evidenza una marcata reazione astrocitaria. Il quadro neuropatologico riscontrato ha permesso di formulare la diagnosi di Necrosi del Corno di Ammone concordemente con quanto segnalato dagli Autori Svizzeri.

Congresso Nazionale

“Aggiornamenti in Patologia Veterinaria”

Fossano (CN) 24-25 Maggio 2002

**STUDIO ISTOLOGICO E ULTRASTRUTTURALE DI DUE CASI DI
LEUCODISTROFIA A CELLULE GLOBOIDI NEL CANE**

*M. Prunotto**, *M. Galloni**, *D. Catalano***, *E. Cornaglia***, *M. T. Capucchio***

Università degli Studi di Torino

* Dipartimento di Morfologia Veterinaria

** Dipartimento di Patologia Animale

La leucodistrofia a cellule globoidi (GLD) è una patologia neurologica autosomica recessiva che colpisce l'uomo ed alcune specie animali (cani, gatti, pecore e topi) causata da una mutazione nel gene della galattosilcerebrosidasi, enzima responsabile della degradazione lisosomiale di molti galattolipidi. Gli autori descrivono due casi di GLD osservati in cani di 3 mesi di età, di razza West Highland White Terrier (WHWT) provenienti dalla medesima cucciolata presentati alla visita neurologica a causa dell'insorgenza di una paraparesi a decorso progressivo. Dopo la soppressione degli animali, resa necessaria dall'aggravamento della sintomatologia, campioni di encefalo, midollo spinale, fegato, rene, cuore, polmone e muscolo scheletrico sono stati fissati in idonei fissativi e inclusi sia in paraffina, sia in resina idrofila a base di metacrilati, sia in resine epossidiche. Sulle sezioni incluse in paraffina e in resina idrofila sono state effettuate colorazioni morfologiche e istochimiche e precisamente le colorazioni ematossilina-eosina e blu di toluidina-fucsina acida. È stata così evidenziata la presenza di lesioni da moderate a molto gravi a carico della sostanza bianca dell'intero nevrasse. Demielinizzazione, degenerazione assonale e gliosi erano ben visibili, ma l'elemento peculiare era rappresentato da accumuli perivasali di cellule voluminose con nucleo centrale o eccentrico e citoplasma granuloso, le caratteristiche cellule di Krabbe di derivazione macrofagica. Il migliore dettaglio morfologico è stato raggiunto con le sezioni semifini incluse in resina idrofila sulle quali sono state effettuate reazioni istochimiche con valore di controllo: colorazione Alcian Blu a pH 1 e pH 2.5 e colorazione PASM. Mediante tali colorazioni è stato possibile rispettivamente escludere la diagnosi di leucodistrofia metacromatica e evidenziare chiaramente gli accumuli citoplasmatici nelle cellule globoidi. L'esame ultrastrutturale ha permesso di valutare il contenuto delle cellule globoidi rappresentato da guaine mieliniche degenerate, ma in particolare da strutture circondate da membrana in forma di tubuli impaccati e ripiegati tipici della leucodistrofia globoide confermando la diagnosi formulata in base al quadro clinico e all'esame istologico.

**UTILIZZO DELLA TECNICA DI IS-PCR ASSOCIATA AD IMMUNOISTOCHEMICA
PER L'IDENTIFICAZIONE DI POPOLAZIONI CELLULARI INFETTE
DA MAEDI-VISNA VIRUS**

M. Mazzei, M.L. Carrozza, P. Bandecchi, F. Tolari, M. Arispici*

Dipartimento di Patologia Animale, Profilassi ed Igiene degli Alimenti, Università di Pisa

* Scuola Normale Superiore, Pisa

Maedi-Visna (MV) è una malattia infettiva ovina segnalata in diversi paesi. L'agente causale è un virus ad RNA appartenente alla famiglia *Retroviridae*, genere *Lentivirus*. MV, analogamente alle altre affezioni sostenute da lentivirus, è caratterizzata da un lungo periodo di incubazione. I sintomi clinici, osservabili solo in animali adulti, consistono in difficoltà respiratorie, calo della produzione latte, e deperimento generale. Con il progredire della malattia le condizioni generali dell'animale si aggravano fino alla morte. La sintomatologia trova riscontro anatomopatologico in una polmonite cronica interstiziale ed in una mastite indurativa linfocitaria, entrambe caratterizzate da iperplasia delle cellule mononucleate prevalentemente di tipo linfo-plasmacellulare, spesso disposte a formare centri germinativi. Le principali cellule bersaglio del virus appartengono alla linea monocito-macrofagica. Studi recenti, basati su infezioni sperimentali effettuate sia *in vivo* che *in vitro*, hanno messo in evidenza che il virus MV può infettare anche cellule epiteliali, fibroblasti, cellule endoteliali e cellule della muscolatura liscia. Scopo del lavoro è la visualizzazione e l'identificazione dei tipi cellulari infettati dal virus MV nel polmone e nella ghiandola mammaria di animali naturalmente infetti, identificati mediante analisi sierologiche in allevamenti della provincia di Pisa e Lucca. A tale fine è stata impiegata la tecnica di IS-PCR applicata ad un segmento (218bp) del gene *pol*. Le cellule infette, riconoscibili in base ad una intensa colorazione nucleare, sono risultate uniformemente distribuite nel contesto del tessuto in esame ed in scarso numero. Su base morfologica sono stati riconosciuti, pneumociti, fibroblasti e adipociti. L'applicazione della metodica immunoistochimica (ABC), dopo l'amplificazione ha inoltre permesso di individuare cellule infette epiteliali riconoscibili per la loro reattività verso un anticorpo anti pan-CK, macrofagi reattivi ad un anticorpo anti-MAC1 e rare cellule endoteliali identificate da un anticorpo anti F-VIII. L'infezione di queste cellule ha probabilmente un ruolo importante nello sviluppo della risposta infiammatoria; infatti l'endotelio infetto aumenta l'espressione di V-CAM1, un ligando delle integrine coinvolto nella adesione delle cellule mononucleari all'endotelio, fase preliminare al transito attraverso la parete vascolare.

**CARCINOMA PROSTATICO CON METASTASI POLMONARI E MIOCARDICHE
IN UN GATTO**

M. Tursi, S. Iussic*, T. Costa***

* Università degli Studi di Torino - Dipartimento di Patologia Animale - Via Leonardo da Vinci 44, Grugliasco (To)

** Centro Veterinario Torinese, Lungodora Colletta, 147 - Torino

Un gatto europeo maschio di 12 anni, FIV positivo è stato sottoposto ad indagine necroscopica dopo aver manifestato sintomi generici di malattia delle vie urinarie, dolore generalizzato ed anoressia.

All'esame necroscopico le condizioni di nutrizione erano modeste, erano presenti noduli biancastri del diametro di circa 1-2 cm sui lobi diaframmatici di entrambi i polmoni e sulla parete libera del ventricolo sinistro. La porzione prossimale dell'uretra pelvica si presentava moderatamente ispessita, di colore bianco-grigiastro ed all'apertura del lume uretrale si osservava un marcato ispessimento della parete responsabile dei disturbi dell'urinazione.

Dopo fissazione in formalina ed utilizzando le routine tecniche dell'istopatologia sono stati sottoposti ad esame istopatologico sezioni dell'uretra pelvica, dei noduli polmonari e miocardici, rene, fegato, corteccia cerebrale, mesencefalo e tronco encefalico caudale.

Il reperto istopatologico delle sezioni dell'uretra pelvica rileva nello strato spongioso una proliferazione di cellule epiteliali con formazione di strutture alveolari, all'interno delle quali le cellule neoplastiche formano strutture papillari, stratificate ed in parte solide, sporgenti nel lume. Le cellule sono caratterizzate da spiccato pleomorfismo, elevato indice mitotico e numerose mitosi atipiche. Cordoni neoplastici infiltrano il muscolo uretrale; sono presenti numerose metastasi intravascolari ematiche e vaste aree necrotiche. Attorno alla neoformazione è visibile un'abbondante reazione connettivale. La stessa struttura istologica si rileva nei noduli metastatici polmonari e miocardici. A carico della midollare del rene sinistro è presente una focale metastasi.

Le sezioni descritte sono state sottoposte ad indagine immunoistochimica utilizzando la tecnica ABC (sistema di rivelazione multilink, BioGenex, San Ramon) e l'anticorpo primario anti-antigene prostatico specifico (PSA, DAKO, Glostrup, Denmark) con concentrazione di 1:500. La reazione immunoistochimica delle neoformazioni risulta positiva e specifica.

Da reperti macroscopici, istopatologici ed immunoistochimici si può concludere che la neoformazione uretrale è un carcinoma della prostata disseminata con metastasi multiple.

DISORDINI EMATOPOIETICI NEL GATTO: ASPETTI CLASSIFICATIVI ED ASSOCIAZIONE CON LE PRINCIPALI MALATTIE VIRALI FELINE

S. Comazzi, A. Giordano, M. E. Gelain, C. Masserdotti §

Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Università degli Studi di Milano, § Clinica Veterinaria S. Antonio, Salò

Lo studio delle malattie linfomieloproliferative nella specie felina si basa essenzialmente sulla classificazione FAB che prende in considerazione la morfologia solo in parte integrata da riscontri citochimici. Tuttavia tale classificazione non risulta correlata al comportamento biologico né alla risposta alle terapie rendendo quindi indispensabile il ricorso ad aspetti aggiuntivi quali la determinazione dell'immunofenotipo e di eventuali alterazioni citogenetiche coinvolte nella neoplasia. Nella specie felina è stata inoltre dimostrata la elevata associazione di tali forme con la positività sierologica al virus della leucemia (FeLV) e dell'immunodeficienza (FIV) felina. Tali test sierologici non risultano tuttavia in grado di evidenziare eventuali infezioni latenti.

Scopo di questo lavoro è indagare gli aspetti classificativi di 28 casi di malattie linfomieloproliferative nella specie felina con particolare riferimento all'identificazione del genoma dei provirus FeLV e FIV integrati nel DNA dei leucociti circolanti, mediante metodica PCR.

Sono stati prelevati campioni di sangue, midollo, linfonodi, fegato, milza, masse tumorali solide o versamenti. Sui campioni di sangue, midollo e sugli strisci citologici dei gatti sospetti, sono stati valutati aspetti ematologici e morfologici, citochimici (mieloperossidasi, naftilacetato esterasi, e cloracetato esterasi, fosfatasi acida e alcalina) ed immunocitochimici (CD5, CD4, CD8, CD21, CD11b). Alla luce di tali aspetti sono state identificate 10 leucemie linfoide acute (ALL) o linfomi leucemici, 5 leucemie mieloidi acute (AML), 3 leucemie acute non ulteriormente classificate a causa dello scarso campionamento (AL nc), 4 mielodisplasie (MDS), 4 leucemie linfocitiche croniche (CLL) e 2 leucemie mieloidi croniche (CML). Il genoma provirale è stato evidenziato in 5 ALL, 3 AML, 1 AL nc, 1 MDS e 1 CLL per il virus FeLV e in 2 su 5 AML, 2 su 3 AL nc e 1 su 3 MDS per il virus FIV.

I risultati ottenuti hanno confermato la notevole importanza soprattutto dell'infezione FeLV nella patogenesi, in particolare delle leucemie acute e delle forme mielodisplastiche, nonostante l'incidenza nei nostri casi sia risultata più bassa rispetto a quanto ottenuto in letteratura con l'uso di soli test sierologici. Il pannello di test utilizzato ha permesso di evidenziare aspetti ulteriori rispetto alla semplice morfologia anche in campioni conservati e si è quindi rivelato utile anche a studi retrospettivi. In particolare l'immunocitochimica ha permesso di evidenziare l'immunofenotipo nella maggior parte delle forme linfoide, mentre la citochimica si è rivelata molto utile alla classificazione delle forme mieloidi.

DERMATITE HERPETICA FELINA

F. Abramo, K. Bucci, G. Lazzeri**, V. Fornari**

Dipartimento di Patologia Animale - * Dipartimento di Clinica Veterinaria, Università di Pisa, **Libero professionista, Firenze.

L'herpesvirus felino tipo 1 è responsabile di infezioni del tratto respiratorio superiore (rinotracheiti), di polmoniti, di glossiti, di congiuntiviti, di cheratiti e di aborti. In corso di questa infezione è stato raramente documentato il coinvolgimento cutaneo. Lo scopo della presente comunicazione è segnalare due casi di dermatite herpetica felina: in entrambi l'infezione era caratterizzata clinicamente da dermatite ulcerativa facciale con erosioni a carico della regione nasale e sottoorbitale, nel primo caso lesioni ulcerative cutanee erano anche presenti agli arti anteriori. Istologicamente, le alterazioni cutanee rilevabili nel primo caso erano prevalentemente di tipo necrotico con marcato coinvolgimento delle strutture follicolari e scarsa componente infiammatoria. Nonostante non fossero presenti i caratteristici corpi inclusi si notava marginazione della cromatina nei cheratinociti residui. Il virus è stato identificato dalle croste mediante microscopia elettronica. Analogamente a quanto già descritto in medicina umana è stata emessa diagnosi di ulcera herpetica cronica. Nel secondo caso la dermatite era caratterizzata da iperplasia dell'epidermide e presenza di corpi inclusi intranucleari amfofilici e di caratteristico aspetto metallico, in aree focali, a carico dei cheratinociti della parete follicolare a livello di bulbo, istmo e infundibulo. Con il siero prelevato dal primo gatto nella fase acuta della malattia sono state condotte indagini di immunoistochimica che hanno consentito di evidenziare una netta positività nucleare nelle aree cutanee follicolari di sezioni biottiche provenienti dal secondo gatto. In alternativa all'isolamento virale o ad indagini più sofisticate quali la PCR e la microscopia elettronica, il rilievo di positività all'immunoistochimica può essere considerato un valido mezzo diagnostico di screening in caso di dermatite ulcerativa facciale di sospetta origine virale (herpetica) nel gatto. In entrambi i casi si è avuta risoluzione delle lesioni cliniche con la sola terapia sintomatica.

IDENTIFICAZIONE NEL SANGUE E IN TESSUTI FELINI DI UNA PROTEINA PARZIALMENTE OMOLOGA ALLA α -1-GLICOPROTEINA ACIDA

A. Giordano, F. Cecilian, G. Sironi, S. Paltrinieri

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

L' α -1-glicoproteina acida (AGP) è una proteina di fase acuta (PFA) la cui concentrazione ematica aumenta in corso di flogosi. La sua funzione non è del tutto chiara anche se sembra coinvolta nella modulazione di risposte funzionali dei granulociti neutrofili. Al di là degli aspetti quantitativi, in medicina umana l'interesse è stato focalizzato anche su aspetti qualitativi: sembra infatti che isoforme caratterizzate da determinati fenomeni di glicosilazione conferiscano un certo grado di resistenza ad alcune patologie. Nel gatto la AGP è la PFA più frequentemente rilevabile ed è stata studiata soprattutto in corso di peritonite infettiva felina (FIP), malattia nella quale raggiunge valori ematici elevati, mentre nei gatti resistenti all'infezione aumenta in circolo solo transitoriamente.

Sebbene esistano kit commerciali basati su metodi immunologici per il rilievo della concentrazione ematica di tale proteina non sono disponibili anticorpi specifici per la AGP felina da usare per la caratterizzazione della proteina nel sangue o per la sua identificazione immunoistochimica.

Il presente lavoro rappresenta il primo passo di uno studio su eventuali alterazioni post-traduzionali dell'AGP felina e si è articolato come segue: utilizzando un anticorpo monoclonale rivolto contro l'AGP umana (Sigma) sono stati effettuati esperimenti di immunoblotting contro AGP purificata da siero felino, contro siero felino e contro omogeneati di tessuto epatico, e prove immunoistochimiche (metodo avidina-biotina perossidasi) su tessuti fissati in formalina ed inclusi in paraffina dopo smascheramento in microonde.

I risultati delle prove di immunoblotting hanno evidenziato che l'anticorpo in questione non riconosce la AGP purificata, ma una proteina sierica di peso molecolare inferiore. Le prove immunoistochimiche hanno evidenziato che tale proteina è presente in sede intraepatocitaria dove è rilevabile una positività granulare diffusa. Tale proteina è stata inoltre localizzata più o meno in tutti i tessuti sotto forma di positività plasmatiche a livello di vasi di piccolo e medio calibro, nei quali risulta particolarmente positivo il margine endoteliale, nonché a livello di voluminose cellule tissutali, morfologicamente assimilabili a macrofagi.

Tali risultati indicano che nel siero felino è presente una proteina di produzione epatica che presumibilmente contiene una sequenza aminoacidica comune ad un tratto di AGP, dalla quale differisce però per le caratteristiche fisiche. Tale proteina differisce da altre PFA in quanto è espressa anche su cellule tissutali. Tali riscontri suggeriscono di approfondire gli studi su tale proteina, in maniera da verificare se si tratti di una forma di AGP peculiare della specie felina o di una proteina diversa a differente significato fisiopatologico.

STEATOSI GIOVANILE SISTEMICA IN UN DOGUE DE BORDEAUX

M. Rondena, C. Giudice, G. Cammarata

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

Con il termine di steatosi giovanile viscerale (JVS) viene indicata una grave forma di steatosi epatica, muscolare e miocardica nota nel bambino ed in un ceppo di topi giovani (C3HOH). Il presente lavoro ha lo scopo di segnalare un caso di JVS in un cucciolo di cane. Un Dogue de Bordeaux maschio di tre mesi, appartenente ad una cucciolata di 5 soggetti, tutti in buona salute, è deceduto poche ore dopo la vendita. Il cadavere congelato è stato sottoposto a necropsia. Nell'allevamento di provenienza non sono stati effettuati trattamenti di alcun genere e l'alimentazione era di tipo commerciale. Un supplemento di anamnesi ha messo in luce fenomeni sporadici di disvitalità e di mortalità neonatale nella stessa struttura, sebbene in momenti diversi. All'esame necroscopico il fegato è apparso modicamente aumentato di volume, di colore diffusamente giallastro, facilmente rompibile ed untuoso al taglio. Il cuore era modicamente aumentato di volume, il miocardio, come pure la muscolatura scheletrica erano pallidi. Dopo l'esame necroscopico, campioni di fegato, miocardio e muscolo, diaframmatico, sono stati in parte fissati in formalina tamponata, inclusi in paraffina, sezionati al microtomo a 4 µm di spessore ed in parte congelati in azoto liquido e sezionati al criostato, sempre a 4 µm di spessore. Le sezioni microtomiche da campioni inclusi in paraffina sono state colorate con ematossilina-eosina, e PAS, mentre quelle criostatiche sono state colorate con Sudan Black e Gomori modificato. All'esame istologico del fegato, il citoplasma della massima parte degli epatociti risultava occupato da vacuoli di diverse dimensioni, tendenti a fondersi in un unico grande vacuolo, il cui contenuto è risultato PAS negativo e Sudan Black positivo, dimostrando l'esistenza di una intesa steatosi. Nella muscolatura striata erano pure evidenziabili vacuolizzazioni sotto forma di minutissime goccioline tra le miofibrille dei miociti e dei miocardiociti, in questi ultimi maggiormente addensate ai poli del nucleo. Anche per le cellule muscolari e cardiache, il Sudan Black ha permesso di dimostrare la natura lipidica degli accumuli citoplasmatici. Le JVS che colpiscono il bambino ed il topo C3HOH, è causata da un difetto genetico riguardante i trasportatori intracellulari di acidi organici carnitina - dipendenti e, come conseguenza, ne risulta una incapacità ad assimilare carnitina da parte dei tessuti. La steatosi epato-muscolare da noi osservata e la giovanissima età del cucciolo configurano una sindrome assai simile alla JVS ed inducono a ritenere che anche animali di specie canina possano esserne colpiti. Ulteriori accertamenti sono attualmente in corso, per la determinazione dei livelli di carnitina libera nel tessuto muscolare prelevato in corso di autopsia, e sul plasma di animali consanguinei provenienti dallo stesso allevamento, allo scopo di confermare la diagnosi.

VALUTAZIONE COMPARATIVA TRAMITE RISONANZA MAGNETICA (MRI) ED ISTOLOGIA DI TUMORI TRAPIANTATI SOTTOCUTE NEL TOPO

R. Bergottini¹, A. Degrassi², J. Klapwijck³, A. M. Giusti³, E. Pesenti², A. Terron³, E. Scanziani¹

¹ Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Sezione di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviare, Università degli Studi di Milano.

² Pharmacia Corporate , Pharmacology Department, Discovery Research Oncology, Nerviano

³ Pharmacia Corporate, Discovery and Development Toxicology, Nerviano.

La risonanza magnetica è un metodo diagnostico non invasivo e privo di rischi sia per il paziente che per l'operatore. In campo sperimentale può essere un utile strumento per valutare l'evoluzione in vivo di alcune patologie; in particolare, in campo oncologico, è stata proposta come metodo di caratterizzazione dei tumori in animali da laboratorio e, successivamente, come strumento di valutazione dell'efficacia di farmaci antitumorali.

Scopo di questo lavoro è la comparazione tra esame con risonanza magnetica ed esame istopatologico di sei linee tumorali umane impiantate sperimentalmente nel topo.

A tale scopo, sono state utilizzati i tumori umani MX1 (carcinoma mammario), HCT116 e HT29 (carcinomi del colon), DU145 (carcinoma prostatico), A2780 (carcinoma ovarico) ed A549 (carcinoma polmonare).

Le cellule tumorali sono state impiantate sottocute in 5 topi nudi per ogni stadio. Dopo analisi preliminari, è stato definito come primo stadio quello in cui il tumore raggiunge un peso di circa 150 mg, terzo quello in cui pesa circa 1.5 gr ed il secondo a metà del tempo necessario per passare dal primo al terzo.

I tumori sono stati sottoposti a risonanza magnetica e per ognuno sono state acquisite, a seconda delle dimensioni, da un minimo di 8 ad un massimo di 16 immagini dalla porzione mediana; in seguito, il tumore è stato processato per l'istologia ed è stata ottenuta una sezione dalla porzione più centrale.

La sezione istologica è stata confrontata con le immagini della risonanza magnetica, fino ad identificare una corrispondenza in base alla forma e alle dimensioni.

Dal confronto di ogni risonanza con la rispettiva istologia, è stato possibile identificare e caratterizzare le aree di necrosi, quelle emorragiche e quelle fibrotiche.

I dati ottenuti indicano che la risonanza magnetica possa essere vantaggiosamente utilizzata per monitorare lo sviluppo e le modificazioni di tumori sperimentalmente indotti in animali da laboratorio.

ATTIVAZIONE DEI GRANULOCITI NEUTROFILI IN PRESENZA DI WOLBACHIA SURFACE PROTEIN (WSP): OSSERVAZIONI PRELIMINARI

S. Paltrinieri, C. Bazzocchi, F. Ceciliani, C. Bandi

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

Varie specie di nematodi filaridi di interesse medico e veterinario ospitano batteri intracellulari Gram-negativi appartenenti al genere *Wolbachia*, posti a livello di corde laterali e di embrioni in via di sviluppo. Tali batteri sembrano coinvolti nelle risposte immunitarie dell'ospite: nel tromboembolismo polmonare rilevabile nel cane dopo embolizzazione di *D. immitis* e nell'oncocercosi umana si evidenzia una risposta neutrofilica, forse rivolta verso molecole di *Wolbachia*.

Scopo di questo lavoro è quello di approfondire il ruolo svolto da una proteina di *Wolbachia* (*Wolbachia* Surface Protein: WSP) nell'attivazione di granulociti neutrofili (PMN) di cane.

Questo studio è stato effettuato su PMN isolati, in condizioni di sterilità mediante centrifugazione su gradienti discontinui di densità con Percoll, dal sangue di 6 cani sani e non affetti da filariosi cardiopolmonare né microfilarie. L'attività chemiotattica è stata valutata in camera di Boyden modificata, utilizzando filtri di acetato di cellulosa (spessore: 150 µm) e misurando la migrazione con il metodo del Leading Front.

Nella prima fase sono state usate, come chemioattrattanti, concentrazioni scalari di WSP ricombinante purificata, e interleukina 8 (IL-8) come controllo positivo, valutando anche l'attività chemiocinetica in assenza di gradiente.

La concentrazione ottimale di WSP corrisponde a 25 ng/ml. A tale concentrazione l'attività chemiotattica esercitata da WSP è risultata superiore a quella esercitata da IL-8. I test eseguiti in assenza di gradiente hanno però dimostrato che tale attività dipende dall'attivazione della chemiocinesi.

Si è voluto allora verificare se tale attivazione non fosse imputabile alla contaminazione della proteina WSP con LPS batterici, potenti attivatori della chemiocinesi, e se la risposta chemiotattica rilevabile in vivo fosse mediata dalla produzione di composti chemioattrattanti rilasciati da altre cellule: in una seconda sessione di test sono stati quindi allestiti pozzetti contenenti WSP e proteinasi K, che degrada le proteine ma non eventuali LPS, e pozzetti contenenti WSP e cellule mononucleate isolate dagli stessi animali.

I risultati hanno escluso che l'attivazione di cui sopra fosse imputabile alla presenza di LPS e che cellule mononucleate incubate con WSP aumentino la risposta chemiotattica dei PMN canini.

In conclusione, WSP induce un priming dei neutrofili, aumentandone l'attività chemiocinetica. Sono ora in corso esperimenti su cani affetti da dirofilariosi per verificare il significato "in vivo" di tali osservazioni.

**"DETERMINAZIONE DEGLI INTERVALLI DI RIFERIMENTO EMATOLOGICI ED ELETTROFORETICI NELLE SPECIE BUTEO BUTEO (POIANA), FALCO TINNUNCULUS (GHEPPIO) E STRIX ALUCO (ALLOCCO):
RISULTATI PRELIMINARI"**

V. Spagnolo, P. Sartorelli, S. Paltrinieri, A. Marzia

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

In letteratura i dati relativi ad indagini ematologiche e biochimiche cliniche nei rapaci sono rari e spesso lacunosi, se non addirittura assenti. E' stato dunque ritenuto utile impostare una ricerca con l'obiettivo di stabilire dei valori di riferimento, anche in considerazione della crescente richiesta di tali esami da parte dei medici veterinari che operano nel settore della fauna selvatica. Abbiamo inoltre voluto verificare la ripetibilità di tali indagini, nonché l'evoluzione nel tempo dei parametri considerati.

A questo scopo è stato analizzato il sangue prelevato da 16 poiane, una delle quali esaminata 2 volte, 10 allocchi, uno dei quali esaminato 2 volte, e 6 gheppi. I soggetti, provenienti da due centri di raccolta della provincia di Milano, si presentavano clinicamente sani o riportavano esiti di lesioni traumatiche, senza implicazioni di carattere flogistico. Tutte le poiane esaminate erano adulte, mentre 4 dei 10 allocchi e 1 dei 6 gheppi erano pulcini.

Sul sangue è stato effettuato l'esame emocromocitometrico completo. Per la conta di eritrociti, leucociti e trombociti è stata utilizzata la camera di Neubauer; è stato valutato il valore dell'ematocrito; l'emoglobina è stata in alcuni casi dosata mediante analizzatore automatico, mentre nella maggior parte dei casi è stata stimata sulla base del valore dell'ematocrito; su striscio ematico è stata effettuata la formula leucocitaria e, in alcuni casi, sono stati stimati i trombociti. Le proteine plasmatiche sono state valutate sia mediante metodica spettrofotometrica che refrattometrica e il plasma è stato sottoposto ad elettroforesi.

Le differenze tra la stima e la conta dei trombociti, e tra la lettura refrattometrica e quella automatica delle proteine plasmatiche sono risultate significative, mentre il dosaggio e la stima dell'emoglobina non evidenziano differenze di rilievo. I risultati ematologici della poiana sono sovrapponibili a quelli riportati nei rari riferimenti bibliografici disponibili, mentre quelli del gheppio appaiono superiori a quelli presenti in letteratura. L'esame elettroforetico ha evidenziato la presenza di una frazione di prealbumine in tutte e 3 le specie. Con questo lavoro si presentano per la prima volta parametri ematologici di riferimento relativi all'allocco ed elettroforetici relativi a tutte e 3 le specie considerate. Gli obiettivi per il futuro sono di ampliare la numerosità dei campioni al fine di fornire dati più rappresentativi della popolazione ed estendere il lavoro ad altre specie di rapaci.