



AIPVet

ASSOCIAZIONE ITALIANA DI PATOLOGIA VETERINARIA

ATTI IV CONGRESSO NAZIONALE

ISSN 1825 - 2265



ALBERESE (GR)

Parco Naturale della Maremma

24-25 Maggio 2007

SPONSOR



Premio Ennio Sanna 2007

L'ONCOGENE MET NELL'OSTEOSARCOMA CANINO: STUDIO DI UN MODELLO PER LO SVILUPPO DI TERAPIE GENICHE INNOVATIVE

De Maria Raffaella, Miretti Silvia, Iussich Selina, Olivero Martina, Levine Roy, Buracco Paolo, Di Renzo Maria Flavia, Biolatti Bartolomeo

Premio Rosario Preziosi 2007

DUE CASI DI CARCINOMATOSI LEPTOMENINGIALE NEL CANE

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

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

Relazioni ad invito

PATOLOGIA DELLA FAUNA SELVATICA: TUBERCOLOSI DEL CINGHIALE E CHERATOCONGIUNTIVITE INFETTIVA DEL CAMOSCIO

Bollo Enrico

VALORE DIAGNOSTICO DELL'ESAME CITOLOGICO DELLE NEOPLASIE GASTRO-INTESTINALI DEL CANE E DEL GATTO

Bonfanti Ugo

ASPETTI CITOLOGICI DELLE NEOPLASIE ANNESSIALI CUTANEE

Masserdotti Carlo

Comunicazioni

INDAGINE SUL NODELLO EQUINO IN CORSO DI PATOLOGIA SPONTANEA: APPROCCIO INTERDISCIPLINARE

Riccaboni Pietro, Rondena Marco, Scandella Massimiliano, Zani Davide, Di Giancamillo Mauro, Sironi Giuseppe, Finazzi Mario

ESPRESSIONE DELLE METALLOPROTEASI DI MATRICE NELLE MIOSITI DEI MUSCOLI MASTICATORI DEL CANE

Paciello Orlando, Shelton G. Diane, Francesca Trapani, Serenella Papparella

COLESTEATOMA CANINO: CARATTERISTICHE IMMUNOISTOCHEMICHE ED INDICE DI PROLIFERAZIONE DEL RIVESTIMENTO EPITELIALE

Giudice Chiara, Barbara Banco, Rondena Marco, Travetti Olga, Di Giancamillo Mauro, Mortellaro Carlo Maria, Finazzi Mario

FASCITE NECROTIZZANTE CON SINDROME DA SHOCK TOSSICO CAUSATA DA *ACINETOBACTER BAUMANNII*: DESCRIZIONE DI UN CASO IN UN GATTO

Brachelente Chiara, Wiener Dominique, Malik Yasminda, Huessy Daniela, Capuccini Silvia, Mechelli Luca

INFIAMMAZIONE XANTOGRANULOMATOSA DELL'INTESTINO TENUE IN UN CANE

Romanucci Mariarita, Malatesta Daniela, Guardiani Pierluigi, Frescura Paolo, Della Salda Leonardo

COLESTEATOMA INTRACRANICO IN UN GATTO

Ricci Emanuele, Abbiati Gianluca, Salvadori Claudia, Arispici Mario, Cantile Carlo

APPLICAZIONE DELLA CLASSIFICAZIONE NATIONAL HEALTH SERVICE BREAST SCREENING PATHOLOGY (NHSBSP) NELLA COMPARAZIONE CITO-ISTOLOGICA DEI TUMORI MAMMARI DELLA CAGNA

Antuofermo Elisabetta, Rocca Stefano, Burrai Giovanni, Pirino Salvatore, Castiglia Paolo, Marras Vincenzo

STUDIO DELLE LESIONI INTRAEPITELIALI MAMMARIE (IELS) NEL CANE. UN VALIDO MODELLO PER LO STUDIO DEL CANCRO ALLA MAMMELLA DELLA DONNA

Antuofermo Elisabetta, Pirino Salvatore, Burrai Giovanni, Miller Margaret, Badve Sunil, Mohammed Sulma

I MASTOCITI NELLA GHIANDOLA MAMMARIA DEL CANE: ESISTE UNA CORRELAZIONE CON LA PROGRESSIONE NEOPLASTICA?

Sfacteria Alessandra, Mazzullo Giuseppe, Macrì Battesimo

ESPRESSIONE DEL VEGF NEL CARCINOMA INFIAMMATORIO MAMMARIO DELLA CAGNA

Millanta Francesca, Ressel Lorenzo, Citi Simonetta, Caneschi Veronica, Poli Alessandro



L'ONCOGENE MET NELL'OSTEOSARCOMA CANINO: STUDIO DI UN MODELLO PER LO SVILUPPO DI TERAPIE GENICHE INNOVATIVE

De Maria Raffaella, Miretti Silvia, Iussich Selina, Olivero Martina, Levine Roy, Buracco Paolo, Di Renzo Maria Flavia, Biolatti Bartolomeo

SISTEMI INFORMATIVI GEOGRAFICI IN ONCOLOGIA VETERINARIA

Paciello Orlando, De Leo Marcello, Musella Vincenzo, Papparella Serenella

CARATTERIZZAZIONE CLINICA, MORFOLOGICA ED IMMUNOISTOCHEMICA DEI TUMORI PERIVASCOLARI DEL CANE

Avallone Giancarlo, Caniatti Mario, Stefanello Damiano, Chiara Palmieri, Roccabianca Paola

VALUTAZIONE DEL RIARRANGIAMENTO GENICO DEI RECETTORI ANTIGENICI IN CORSO DI NEOPLASIE EMATOPOIETICHE CANINE

Gelain M.E., Di Gravio S., Comazzi S.

ANALISI ISTOPATOLOGICA DEI MARGINI CHIRURGICI IN CASO DI FIBROSARCOMA VACCINO-ASSOCIATO NEL GATTO E DI MASTOCITOMA NEL CANE

Tursi Massimiliano, Rocco Valentina, Aresu Luca, Martano Marina, Morello Emanuela, Valenza Federico, Iussich Selina

LESIONI NODULARI DI ORIGINE APOCRINA NEL GATTO PERSIANO: DESCRIZIONE DI 6 CASI

Sforna Monica, Brachelente Chiara, Lepri Elvio, Mechelli Luca

UN CASO DI LINFOMA A GRANDI LINFOCITI GRANULOSI (LGL) IN UN CAVALLO: CARATTERIZZAZIONE ISTOCHEMICA ED IMMUNOFENOTIPICA

Antuofermo Elisabetta, Nuvoli Sara, Cossu Rocca Paolo, Mura Tonina, Rocca Stefano, Burrari Giovanni, Farigu Serafina, Columbano Nicola, Pirino Salvatore, Leoni Antonio

NODULO FIBROISTIOCITARIO SPLENICO IN UN CANE DIAGNOSTICATO INIZIALMENTE COME LINFOMA

Gregori Michela, Pagani R, Bernabei Daniela, Castelli Ilaria

PRODUZIONE DI PROTEINE DI FASE ACUTA IN COLTURE PRIMARIE DI EPATOCITI FELINI

Giordano Alessia, Paltrinieri Saverio

STUDIO DELL'EFFETTO DELL'ALPHA-1-GLICOPROTEINA ACIDA BOVINA SULLA CHEMOTASSI DI NEUTROFILI E DI MONOCITI BOVINI E SULL'ESPRESSIONE DEGLI ANTIGENI DI MEMBRANA CD11B, CD18 E CD47

Lecchi Cristina, Cecilian Fabrizio, Bernasconi Sergio, Perfetto Stefano, Franciosi Federica, Bronzo Valerio, Sartorelli Paola

ALLESTIMENTO DI CONTROLLI POSITIVI PER LA VALUTAZIONE DI ANTICORPI PRIMARI ANTI-BATTERI IN TEST IMMUNOISTOCHEMICI

Recordati Camilla, Radaelli Enrico, Lombardi Guerino, Scanziani Eugenio

IMPIANTO DI CELLULE STAMINALI EMBRIONALI OVINE IN LESIONI CARTILAGINEE: OSSERVAZIONI PRELIMINARI

Rocca Stefano, Antuofermo Elisabetta, Dattena Maria, Manunta Maria Lucia, Pilichi Susanna, Floriana Meloni, Leoni Antonio

TRASFERIMENTO DI EMBRIONI OTTENUTI MEDIANTE TECNICHE DI RIPRODUZIONE ASSISTITA NELLA SPECIE OVINA: ANOMALIE MORFOLOGICHE E VASCOLARI DURANTE LA FASE INIZIALE DELLA GRAVIDANZA

Palmieri Chiara, Borowicz Pawel, Reynolds Lawrence, Ptak Grazyna, Loi Pasqualino, Daniela Malatesta, Della Salda Leonardo

RILIEVI ISTOPATOLOGICI ED IMMUNOISTOCHEMICI IN FETI BOVINI ABORTITI IN FRIULI VENEZIA GIULIA

Pittioni Eugenio, Pascotto Ernesto, Galeotti Marco

TRANSIZIONE EPITELIO-MESENCHIMALE DELLE CELLULE TUBULARI RENALI NELLA GLOMERULONEFRITE MEMBRANOSA E MEMBRANO-PROLIFERATIVA DEL CANE

Aresu Luca, Rastaldi Maria Pia, Scanziani Eugenio, Baily James, Radaelli Enrico, Pregel Paola, Valenza Federico



MICROEPATITI NEI SUINI

Paolo Stefano Marcato, Giuseppe Sarli, Gianfranco Militerno, Serena Panarese, Barbara Bacci, Antonella Perillo, Guerino Lombardi

RISULTATI PRELIMINARI DI UN INFEZIONE SPERIMENTALE CON HEV IN SUINETTI NATURALMENTE INFETTI CON CIRCOVIRUS TIPO 2

Daniela Gelmetti, Monica Cerioli, Nadia Losio, Roberto Faita, Enrico Pavoni, Andrea Luppi, Paolo Cordioli, Guerino Lombardi

RILIEVI ANATOMOISTOPATOLOGICI IN CASI DI ANEMIA INFETTIVA EQUINA CLINICAMENTE MANIFESTI

Lepri Elvio, Sforza Monica, Passamonti Fabrizio, Vitellozzi Giovanni

LESIONI ANATOMOPATOLOGICHE IN UN CASO DI INFEZIONE LETALE DA ENCEPHALOMIOCARDITIS VIRUS (EMCV) IN UN LEMUR CATTI

Pascotto Ernesto, Gelmetti Daniela, Codolo Roberta, Guadagnini Davide, Magnone William, Sandri Camillo, Luppi Andrea, Galeotti Marco

ULTERIORI POLIMORFISMI DEL GENE DELLA PROTEINA PRIONICA RIDUCONO SIGNIFICATIVAMENTE LA SUSCETTIBILITA' ALLA SCRAPIE DEGLI OVINI CON GENOTIPO ARQ/ARQ

Maestrale Caterina, Carta Antonello, Attene Sonia, Sechi Stefania, Galistu Adriana, Santucci Cinzia, Cancedda Giovanna Maria, Saba Mariangela, Patta Cristiana, Bandino Ennio, Demontis Franca, Uras Patrizia, Ciriaco Ligios

PRP^{SC} NELLE GHIANDOLE SALIVARI DI PECORE AFFETTE DA SCRAPIE

Vascellari Marta, Nonno Romolo, Mutinelli Franco, Bigolaro Michela, Di Bari Michele Angelo, Melchiotti Erica, Marcon Stefano, D'Agostino Claudia, Vaccari Gabriele, Conte Michela, De Grossi Luigi, Rosone Francesca, Giordani Francesco, Agrimi Umberto

Poster

CITOMORFOMETRIA NUCLEARE PER LA VALUTAZIONE DI MICROMETASTASI LINFONODALI IN CANI CON MASTOCITOMA CUTANEO: RISULTATI PRELIMINARI

Abramo Francesca, Marconato Laura, Francione Deborah, Gregori Michela, Masserdotti Carlo, Leotta Roberto, Marchetti Veronica

MASTITE BOVINA DA *PROTOTHECA ZOPFII*: OSSERVAZIONI ANATOMO-ISTOPATOLOGICHE

Amatiste Simonetta, Eleni Claudia, Grifoni Goffredo, Falchi Antonella, Rosati Remo

IL LIPOSARCOMA NEL CANE E NEL GATTO: STUDIO ISTOLOGICO ED IMMUNOISTOCIMICO DI 31 CASI

Bacci Barbara, Bettini Giuliano, Bleeke Cristina

ESPRESSIONE DI MARKER DI PROLIFERAZIONE E DETERMINAZIONE DEI GLICOSAMINOGLICANI NELLA RIPARAZIONE DEL TENDINE D'ACHILLE DEL RATTO

Bollo Enrico, Tursi Massimiliano, Gandini Marco, Bellino Claudio, Amedeo Stefano

IL RUOLO DEL PAPILOMAVIRUS BOVINO TIPO 2 NEI TUMORI VASCOLARI DELLA VESCICA URINARIA DEL BOVINO

Borzacchiello Giuseppe, Russo Valeria, Balcos Liviu, Spoleto Claudia, Rizzo Consuelo, Venuti Aldo, Roperto Sante, Roperto Franco

EFFETTI SULLA MORFOLOGIA DEL TIMO A SEGUITO DELLA SOMMINISTRAZIONE DI DESAMETAZONE A DOSI TERAPEUTICHE ED ANABOLIZZANTI NEL BOVINO

Cannizzo Francesca Tiziana, Miniscalco Barbara, Bollo Enrico, Guglielmino Roberta, Riondato Fulvio, Farinetti Paola, Biolatti Bartolomeo

BLASTOMA POLMONARE DEL BOVINO

Carminato Antonio, Bozzato Elisa, Trevisan Laura, Vascellari Marta, Catania Salvatore, De Palma Domenico, Mutinelli Franco



LIPOLEIOMIOMA VAGINALE IN UN CANE

Carminato Antonio, Bozzato Elisa, Vascellari Marta, Mutinelli Franco

STUDI SULLA ESPRESSIONE LOCALE E SISTEMICA DELLA PROTEINA DI FASE ACUTA α_1 -GLICOPROTEINA ACIDA IN CORSO DI ARTRITE INDOTTA DA CAEV

Cecilian Fabrizio, Lecchi Cristina, Piccinelli Sara, Pagani Arianna, Rahman Mizanur, Maccalli Marina, Pisoni Giuliano, Miranda-Ribera Alba, Sartorelli Paola

VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE IMMUNOCITOCHIMICA DI CD117 IN PREPARATI CITOLOGICI DA MASTOCITOMA

Cesari Alessandro, Marconato Laura, Capitani Ombretta, Bettini Giuliano

MICROLITIASI TESTICOLARE ASSOCIATA A TUMORI DELLE CELLULE GERMINALI IN UN CANE

Mario Cinone, Marielda Cataldi, Francesca Carella, Giulio Aiudi, Roberta Di Terlizzi, Gionata De Vico

VALUTAZIONE DI METODICHE AUTOMATIZZATE PER LA DETERMINAZIONE DEI PARAMETRI EMATOLOGICI IN ORATA (*SPARUS AURATA*)

Comazzi Stefano, Volpatti Donatella, Pertica Giulia, Contessi Barbara, Bulfon Chiara

DATI PRELIMINARI SULLE VARIAZIONI DELLE SOTTOPOPOLAZIONI LINFOCITARIE E DELLA FRAZIONE APOPTOTICA NEL LATTE E NEL SANGUE PERIFERICO DI BOVINE IN ASCIUTTA

Gelain ME, Daprà V, Piccinini R, Zeconi A

ALTERAZIONI ISTOPATOLOGICHE BRANCHIALI IN ZEBRAFISH ADULTI INDOTTE DALLA ESPOSIZIONE ACUTA A DISINFETTANTI: MODELLO SPERIMENTALE

Michela Gregori, Carlo Pretti, Luigi Intorre, Giovanni Braca, Francesca Abramo

STUDIO BIOCHIMICO E IMMUNOISTOCHEMICO SULLA MELANOSI DEL SUINO NERO SICILIANO

Lanteri G., Marino F., Laganà G., Bellocco E., Liotta L., Macrì B.

MYCOPLASMA OVIPNEUMONIAE E LA POLMONITE ATIPICA DEGLI OVINI IN ITALIA: REPERTI ANATOMO-PATOLOGICI ED IMMUNOISTOCHEMICI

Loria Guido, Ruggero, Di Marco Vincenzo, Monteverde Vincenzo, Militello Claudia, Nicholas Robin, Radaelli Enrico, Scanziani Eugenio

DUE CASI DI CARCINOMATOSI LEPTOMENINGIALE NEL CANE

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

SINDROME VESTIBOLARE PARADOSSA IN UN BOXER CON MEDULLOBLASTOMA CEREBELLARE

Mandrioli Luciana, Panarese Serena, Biserni Roberta, Gandini Gualtiero, Bettini Giuliano

INDAGINI IMMUNOISTOCHEMICHE SU UN TUMORE PROSTATICO PRIMARIO A CELLULE FUSATE IN UN CANE

Millanta Francesca, Vannozzi Iacopo, Lorenzi Davide, Poli Alessandro

ANGIOENDOTELIOMATOSI REATTIVA SISTEMICA FELINA (FSRA)

Pezzolato Marzia, Varello Katia, Borlatto Laura, Iulini Barbara, Avallone Giancarlo, Bozzetta Elena

INVAGINAMENTO INTESTINALE DIGIUNO – DIGIUNALE IN ASSOCIAZIONE A GAGLIONEURITE MIENTERICA IN UN VITELLO

Rondena Marco, Riccaboni Pietro, Pravettoni Davide, Morandi Nicola; Zani Davide, Scandella Massimiliano, Belloli Angelo, Finazzi Mario

IL PROGETTO TRACENET (SURVEY FOR TECHNOLOGICAL NEEDS IN TRACEABILITY FOR FOOD SAFETY)

Paola Sartorelli, Cristina Lecchi, Fabrizio Cecilian, Paolo Moroni, Alba Miranda Ribera, Vario Bronzo, Giuliano Pisoni

BRONCOPOLMONITI PARASSITARIE DA *ANGIOSTRONGYLUS VASORUM* E *AELUROSTRONGYLUS ABSTRUSUS* NEL CANE E NEL GATTO

Scaramozzino Paola, Eleni Claudia, De Liberato Claudio, Mastromattei Antonio, Scholl Francesco



OSTEOSARCOMA DEL CANE. STUDIO ISTOLOGICO ED IMMUNOISTOCHEMICO DI 45 CASI

Scarpa Filippo, Bettini Giuliano, Cesari Alessandro

DIFFUSIONE DI PCV2 NELLA POPOLAZIONE DI CINGHIALI (*SUS SCROFA*) NELLE PROVINCE DI GROSSETO E PISA

Verin Ranieri, Ricci Martina, Taccini Ennio, Poli Alessandro

PATOLOGIA DELLA FAUNA SELVATICA: TUBERCOLOSI DEL CINGHIALE E CHERATOCONGIUNTIVITE INFETTIVA DEL CAMOSCIO

Enrico Bollo

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

La tubercolosi è una malattia infettiva cronica sostenuta da bacilli acido-alcol resistenti appartenenti al genere *Mycobacterium*. Il microrganismo possiede un ampio spettro d'ospite, comprendente l'uomo, gli animali domestici, i volatili e molte specie di animali selvatici. I micobatteri vengono inquadrati nella famiglia *Mycobacteriaceae*, genere *Mycobacterium*. La specie gruppo-specifica è rappresentata da *M. tuberculosis*, responsabile della tubercolosi umana, mentre per gli animali le specie più importanti sono *M. bovis* e *M. avium*.

La tubercolosi è una malattia ubiquitaria, sia negli animali domestici che selvatici, e la sua insorgenza è correlata a fattori relativi alla razza, all'età, al sesso degli animali e a situazioni igieniche e carenziali. Nei selvatici, a causa delle ridotte possibilità di trasmissione, la tubercolosi non è molto frequente, anche se in alcune aree sta assumendo un'importante diffusione nelle popolazioni selvatiche di cinghiali. In particolare, nell'entroterra ligure (province di Imperia e Savona) sono state evidenziate positività per *M. bovis* variabili dal 20,1% al 36,5% dei soggetti con lesioni simil-tubercolari a carico dei linfonodi cervicali. È stato suggerito che l'infezione, nel cinghiale, possa essere contratta tramite il pascolamento da bovini infetti (nel caso di infezione da *M. bovis*) o da scarichi fognari non dotati di adeguati impianti di depurazione (nel caso di infezione da *M. tuberculosis*), anche in considerazione della lunga persistenza dei micobatteri nei materiali infetti nell'ambiente.

Altri selvatici, in altre aree geografiche contribuiscono a contaminare con le feci e le secrezioni respiratorie le acque e i terreni, come il tasso in Europa (Gran Bretagna) e una specie di opossum in Nuova Zelanda.

La cheratocongiuntivite infettiva delle specie appartenenti ai generi *Rupicapra* (camoscio) e *Ibex* (stambecco) è una malattia contagiosa che può colpire tutti i capi indipendentemente dall'età e dal sesso, ed il cui agente eziologico è stato individuato in *Mycoplasma conjunctivae*.

In fase di esordio la malattia si manifesta con una congiuntivite acuta monolaterale e poi rapidamente bilaterale che può evolvere sia verso la guarigione sia verso una cheratocongiuntivite purulenta. Il dolore nel corso della fase evolutiva e la successiva cecità incidono sempre in modo grave sul comportamento e sullo stato generale del soggetto.

Per quanto riguarda l'evoluzione delle lesioni oculari, si possono distinguere le fasi di esordio, di acme e delle complicazioni. Nella fase di esordio (della durata di 2-3 giorni) la manifestazione, dapprima unilaterale ma in seguito rapidamente bilaterale, si presenta con una congiuntivite acuta con fotofobia e abbondante lacrimazione. La fase di acme è caratterizzata dall'evoluzione della cheratocongiuntivite che diviene follicolare, associata ad iperemia. Mescolati alle lacrime si osservano flocculi di pus che conglutinano i peli determinandone la caduta a livello del lacrimatoio (regione della guancia ventralmente all'angolo mediale dell'occhio). A carico delle palpebre, il muco mescolato a pus provoca la formazione di croste con occlusione dell'occhio. Questa fase ha una durata di circa 15 giorni e può concludersi con una guarigione senza sequele. Talvolta su soggetti giovani (di circa 1 anno) questa forma può evolvere senza complicazioni nel corso di 2-3 mesi. La fase delle complicazioni è caratterizzata dalla comparsa di una intensa vascolarizzazione della congiuntiva e della cornea, con conseguente opacizzazione di quest'ultima e cecità. Ciò determina un comportamento caratteristico del camoscio: la testa viene portata in basso per supplire con l'olfatto al difetto della vista; l'animale inoltre si muove con esitazione, gira in circolo e spesso, nel corso degli spostamenti, esagera i movimenti degli arti (arpeggio). La cheratite può evolvere favorevolmente verso una guarigione parziale senza pregiudizio per la vista. In altri casi la cecità resta totale.

L'evoluzione può essere ancora diversa: talvolta si assiste infatti alla comparsa sulla cornea di una o più ulcere, che portano alla trasformazione del globo oculare in una massa di pus, o a complicazioni meningo-cerebrali per infezioni ascendenti. Non è rara la perdita completa del bulbo oculare.

A causa della cecità perdurante, le condizioni generali dell'animale vengono compromesse, con conseguente dimagrimento e disidratazione, cachessia e morte.

VALORE DIAGNOSTICO DELL'ESAME CITOLOGICO DELLE NEOPLASIE GASTROINTESTINALI DEL CANE E DEL GATTO

Bonfanti Ugo

Accelera - Nerviano Medical Sciences S.r.l., viale Pasteur 10, 20014, Nerviano (MI), Italy

Obiettivo del presente lavoro è stato valutare i risultati dell'esame citologico di neoplasie del tratto gastroenterico del cane e del gatto comparando biopsia citologica ecoguidata e prelievo mediante apposizione.

Questo studio retrospettivo ha coinvolto 38 cani e 44 gatti affetti da neoplasie del tratto gastroenterico confermate istologicamente.

I risultati degli esami citologici ottenuti da biopsie citologiche ecoguidate (67) e da apposizioni (31) sono stati confrontati con le diagnosi istologiche. Le concordanze tra i risultati sono state classificate in "completa", "parziale", "assente" e "non determinabile".

In 48 su 67 biopsie citologiche ecoguidate (72%) si è verificata concordanza completa o parziale tra diagnosi citologica ed istologica. In 12 biopsie citologiche la concordanza non è stata verificabile poiché il campione citologico è stato valutato insoddisfacente.

In 29 su 31 apposizioni (94%) si è verificata concordanza completa tra diagnosi citologica ed istologica. In 2 apposizioni (6%) la concordanza è stata parziale. Nessun prelievo per apposizione è stato considerato inadeguato.

La proporzione di campioni con concordanza completa, o parziale più completa è stata significativamente più elevata nei prelievi ottenuti mediante apposizione rispetto a quelli ottenuti mediante biopsia citologica ecoguidata ($p < 0.01$).

I risultati hanno dimostrato come la concordanza sia da considerarsi moderata, in riferimento al confronto dei risultati dei campioni ottenuti mediante biopsia citologica ed il risultato istologico. La concordanza dei risultati tra i campioni ottenuti mediante apposizione ed il risultato istologico si è dimostrata maggiore.

Parole chiave: neoplasia, stomaco, intestino, citologia

DIAGNOSTIC VALUE OF CYTOLOGIC EXAMINATION OF GASTROINTESTINAL TRACT TUMORS IN DOGS AND CATS

Objective—To determine results of cytologic examination of fine-needle aspirates and impression smears of gastrointestinal tract tumors in dogs and cats.

Design—Retrospective case series.

Animals—38 dogs and 44 cats with histologically confirmed gastrointestinal tract tumors.

Procedures—Results of cytologic examination of fine-needle aspirates ($n = 67$) or impression smears (31) were compared with the histologic diagnosis, and extent of agreement was classified as complete (ie, agreement in regard to cell lineage and type), partial (ie, agreement in regard to cell lineage, but a lack of agreement in regard to cell type or an inability to characterize cell type), none (ie, lack of agreement in regard to cell lineage or cytologic diagnosis of any non-neoplastic lesion), or undetermined (ie, cytologic specimen was unsatisfactory because of hypocellularity, hemodilution, or necrosis).

Results—For 48 of the 67 (72%) fine-needle aspirates, there was complete or partial agreement between the cytologic and histologic diagnoses. For 12 (18%) aspirates, the extent of agreement could not be determined, because the cytologic specimen was considered unsatisfactory. For 29 of the 31 (94%) impression smears, there was complete agreement between the cytologic and histologic diagnoses, and for 2 (6%) there was partial agreement. None of the impression smears were considered unsatisfactory. Either proportion of complete or complete plus partial agreement was significantly higher for impression smears than fine-needle aspirates ($p < 0.01$).

Conclusions and Clinical Relevance—Results suggest that there was moderate agreement between results of cytologic examination of fine-needle aspirates from dogs and cats with gastrointestinal tract neoplasia and the definitive histologic diagnosis. The agreement between results of cytologic examination of impression smears and the histologic diagnosis appeared to be higher.

Key words: tumor, stomach, intestine, cytology

INDAGINE SUL Nodello EQUINO IN CORSO DI PATOLOGIA SPONTANEA: APPROCCIO INTERDISCIPLINARE

Riccaboni Pietro, Rondena Marco, Scandella Massimiliano*, Zani Davide*, di Giancamillo Mauro*, Sironi Giuseppe, Finazzi Mario

*Facoltà di Medicina Veterinaria – Polo di Lodi
Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria
* Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie*

La sinovia costituisce una barriera anatomica ed immunologica dell'articolazione rappresentando l'epicentro della risposta immunitaria articolare e del ripristino dell'omeostasi, biopsie sinoviali ottenute con tecniche mini – invasive in associazione ad artroscopia e risonanza magnetico-nucleare (RM) potrebbero fornire indicazioni importanti sullo stato dell'articolazione. Scopo di questa segnalazione è correlare quadri macro-microscopici di nodelli equini con patologie articolari spontanee, con i dati delle tecniche artroscopiche descritte. Materiale e Metodi: I nodelli anteriori di 20 cavalli sportivi a fine carriera sono stati prelevati al macello dopo esame obiettivo particolare evidenziante lesioni alla regione. I nodelli sono stati sottoposti ad esame macroscopico durante il quale sono stati prelevati campioni di tessuto sinoviale in corrispondenza del recesso dorsale (D) e dei recessi palmare mediale (M) e laterale (L), fissati in formalina e routinariamente processati. Sezioni di 4 µm sono state colorate con Ematossilina Eosina, van Gieson e Mallory Vannucci, nonché con gli anticorpi anti CD3 e CD79 (policlonale e monoclonale DAKO). Sugli ultimi 16 nodelli, l'esame macroscopico è stato preceduto da risonanza magnetico-nucleare (RM) e da artroscopia. Risultati: Macroscopicamente sono stati di comune riscontro erosioni cartilaginee metacarpali, associate ad iperemia sinoviale. Istologicamente le sinovie hanno mostrato da lieve a moderata flogosi linfoplasmacellulare (CD3+ e CD79+) spesso in associazione a fibrosi e proliferazione connettivale. L'edema riscontrabile in sede sub – sinoviale potrebbe essere interpretabile come una riattivazione flogistica. La RM a basso campo si è dimostrata utile nella diagnosi delle lesioni cartilagineo – ossee, nonché per una buona visualizzazione della sinovia. Conclusioni: Le lesioni evidenziate macro e microscopicamente sono configurabili come artropatia degenerativa e si potrebbero considerare conseguenze dell'età e di ripetuti piccoli traumatismi. Ulteriori indagini saranno necessarie per correlare meglio i risultati anatomico – patologici e clinici, passo fondamentale per l'ottenimento di diagnosi in - vivo sempre più precoci e precise.

Parole chiave: Cavallo, Nodello, Sinovia

MULTIDISCIPLINARY APPROACH TO THE EQUINE METACARPOPHALANGEAL JOINT PATHOLOGY

Early diagnosis of metacarpophalangeal joint pathology is useful for the practitioner and a multidisciplinary approach seems necessary to have a better comprehension about lesions. Furthermore, synovia is the anatomical and immunological barrier of joint. MeM: 20 horse metacarpophalangeal joints were collected from the slaughterhouse. Gross and microscopic examination were immediately performed using HE, van Gieson, Mallory, antibodies against CD3 and CD79. Results: Grossly, common findings represented mostly by cartilage erosions and synovial hyperemia were evident. Histologically mild to moderate chronic lymphoplasmacytic synovitis with fibrosis were detectable. Sub – synovial and perivascular edema was also visible in tot cases and interpreted as sign of active inflammation. Conclusion: The lesions observed are consistent with age related degenerative arthropathy. Further investigations will be made in order to better correlate diagnostic procedure such as artroscopy and magnetic resonance and synovial histological data with aim to correctly interpret in-vivo synovial biopsies, obtained with mini –invasive procedures in course of equine articular pathology.

Key words: Horse, metacarpophalangeal joint, synovial

ESPRESSIONE DELLE METALLOPROTEASI DI MATRICE NELLE MIOSITI DEI MUSCOLI MASTICATORI DEL CANE

Paciello Orlando ^a, Shelton G. Diane ^b, Francesca Trapani ^a, Serenella Papparella ^a

^a *Dipartimento di Patologia e Sanità animale – Settore di Anatomia Patologica. Università degli Studi di Napoli Federico II, via Delpino, 1, 80137 Napoli, Italia.*

^b *Department of Pathology, School of Medicine, University of California at San Diego, La Jolla, CA 92093-0709, USA*

Le MetalloProteasi della matrice extracellulare (MMPs) comprendono una famiglia di endoproteinasi zinco-dipendenti, coinvolte nel rimodellamento della matrice extracellulare in molti processi fisiologici e patologici. Nei processi patologici, sono coinvolte nella cicatrizzazione, nella infiammazione e nel cancro. Nell'infiammazione è noto che le MMPs mediano l'adesione dei macrofagi e dei linfociti T alla matrice e alle cellule endoteliali e la fuoriuscita dei linfociti dal circolo sanguigno ai tessuti.

Per questo motivo abbiamo esaminato, con tecniche di immunoistochimica e di immunofluorescenza singola e doppia, l'espressione di MMP2, MMP7, MMP9, MMP10, TIMP1, nonché del complesso Maggiore di Istocompatibilità di Classe I e CD8, nelle miositi dei muscoli masticatori del cane (MMMM) ed in biopsie muscolari di controllo; mentre con il western blot è stata valutata la quantità delle proteine espresse.

MMP2, MMP7, MMP9 e MMP10 erano espresse sulle fibre muscolari, nell'interstizio e marcavano distintamente le cellule infiammatorie. MMP2, MMP7, MMP9 co-localizzavano con MHC classe I su fibre muscolari non-necrotiche invase da linfociti CD8+.

L'immunoblot mostrava un significativo aumento delle MMPs, ma non dell'inibitore TIMP1.

I nostri risultati suggeriscono un ruolo fondamentale delle MMPs nella patogenesi delle MMMC in particolare l'over-espressione delle MMPs sulle fibre non-necrotiche che esprimono MHC I, facilita l'adesione dei linfociti ed aumenta la citotossicità dei linfociti T attraverso la degradazione delle proteine della matrice extracellulare. Questi aspetti potrebbero avere delle ripercussioni terapeutiche importanti, utilizzando inibitori delle MMPs nei cani affetti da MMM.

Parole chiave: Metalloproteasi, Miositi dei Muscoli Masticatori, infiammazione, matrice extracellulare

EXPRESSION OF MATRIX METALLOPROTEINASES IN THE CANINE MASTICATORY MUSCLE MIOSITIS

Matrix metalloproteinases (MMPs) comprise a family of calcium-dependent zinc endoproteinases involved in the remodeling of the extracellular matrix in a variety of physiologic and pathologic processes. In pathologic processes, MMPs participate in a variety of conditions, including, facilitation of macrophage and T-cell adhesion to matrices and endothelial cells, secretion of membrane-anchored cytokines and exit of lymphoid cells from the circulation to tissues, propagation of an inflammatory response. Because the fundamental process in the immunopathology of inflammatory myopathies is related to activation, transendothelial migration, and adhesion of T cells to the targeted muscle fibers, we investigated the role of MMPs in Canine Masticatory Muscle Myositis. We examined the expression of MMPs with single and double immunocytochemistry using antibodies against MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-10, TIMP-1, major histocompatibility complex (MHC) class I, and CD8. MMPs, were expressed in the muscle, on the membrane and in the interstitium. MMP2, MMP7 and MMP9 immunostained the non-necrotic and MHC class-I-expressing muscle fibers, and immunostained the autoinvasive CD8 cytotoxic T cells. By immunoblotting, MMPs were increased instead TIMP1 was normal. In Conclusion, the overexpression of MMPs on the non-necrotic muscle fibers in CMMM may facilitate lymphocyte adhesion and enhance T-cell-mediated cytotoxicity by degrading extracellular matrix proteins. The findings may have practical implications in considering therapeutic trials with MMP inhibitors in dogs with CMMM.

Key words: Matrix metalloproteinases, Canine Masticatory Muscle Myositis, inflammation, extracellular matrix

CHOLESTEATOMA CANINO: CARATTERISTICHE IMMUNOISTOCHEMICHE ED INDICE DI PROLIFERAZIONE DEL RIVESTIMENTO EPITELIALE

Giudice Chiara*, Barbara Banco*, Rondena Marco*, Travetti Olga#, Di Giancamillo Mauro#, Mortellaro Carlo Maria#, Finazzi Mario*

** Sezione di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviare, # Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie, Università degli Studi di Milano*

Il cholesteatoma auricolare è una rara lesione epiteliale cistica attribuita ad alterata proliferazione dei cheratinociti, la cui espansione conduce ad osteolisi della bolla timpanica. Scopo di questo studio è caratterizzare istologicamente ed immunohistochimicamente 10 casi di cholesteatoma diagnosticato, su base tomografica, in 9 cani, 7 maschi, 2 femmine, di età 5-9 anni (media 6,5). Campioni di tessuto prelevati in corso di chirurgia erano fissati in formalina e processati per l'istologia. Sezioni microtomiche erano indagate immunohistochimicamente (metodo ABC) con anticorpi anti-citocheratine (CK 14, 16, 19) e Ki67 (MIB1). Erano inoltre esaminati 10 campioni di otite cronica. Istologicamente tutti i cholesteatomi erano costituiti da cisti a contenuto cheratinico, delimitate da epitelio pluristratificato squamoso cheratinizzato iperplastico (fino a 25 strati), poggiante su un corion fibrotico moderatamente infiltrato da linfociti, plasmacellule e macrofagi. Nei casi di otite l'epitelio era meno intensamente iperplastico, la flogosi, linfo-istiocitica, spesso più intensa. Immunohistochimicamente l'epitelio dei cholesteatomi era diffusamente CK14 e CK16 +, nelle otiti diffusamente CK14 + e focalmente CK16 +. CK19 era sempre negativa. L'indice di proliferazione dell'epitelio (nuclei MIB1 +/nuclei totali) non era significativamente differente tra i casi esaminati né nei due tipi di lesioni. Coerentemente a precedenti osservazioni condotte nell'uomo, il termine cholesteatoma indica in realtà una cisti epidermoide. L'indice di proliferazione dell'epitelio nei nostri casi non sembrava invece riflettere il grado di aggressività della lesione cholesteatomatosa, come invece hanno suggerito alcuni studi condotti in medicina umana.

Parole chiave: cane, cholesteatoma, otite, orecchio medio

CANINE AURAL CHOLESTEATOMA: IMMUNOHISTOCHEMICAL FEATURES AND EPITHELIAL PROLIFERATION INDEX

Aural cholesteatoma, in humans and dogs, is a rare cystic epithelial lesion, due to an abnormal growth of keratinocytes, whose expansion leads to tympanic bulla osteolysis. Aim of this study was to histologically and immunohistochemically characterize 10 cases of cholesteatoma, diagnosed with CT analysis, in 9 dogs, 7 M/2 F, aged 5-9 years (mean 6.5). Specimens obtained during surgery were formalin fixed and processed for histology. Microtomic sections were immunostained (ABC method) with antibodies anti-cytokeratins (CK 14, 16, 19) and Ki67 (MIB1). 10 archive samples of chronic otitis were also examined. Histologically, in all cases of cholesteatoma a cyst containing abundant keratin debris and lined by a hyperplastic pluristratified squamous keratinized epithelium (up to 25 layers) resting on a fibrous corion infiltrated by lymphocytes, plasmacells and macrophages, was present. Chronic otitis were characterized by lesser epithelium hyperplasia and severe lympho-histiocytic inflammation. Immunohistochemically, cholesteatomatous epithelium was diffusely CK14 and CK16 +; epithelium in otitis was diffusely CK14 + and focally CK16 +. CK19 was always negative. Proliferative index (MIB1 + nuclei/total nuclei), was not significantly different between cholesteatomas and otitis. Consistently with previous observation, cholesteatoma is a misnomer indicating an epidermoid cyst. In our cases, conversely to studies on human cholesteatoma, proliferative index did not seem to reflect the aggressiveness of cholesteatomatous lesion.

Key words: canine, cholesteatoma, otitis, medial ear

FASCITE NECROTIZZANTE CON SINDROME DA SHOCK TOSSICO CAUSATA DA *ACINETOBACTER BAUMANNII*: DESCRIZIONE DI UN CASO IN UN GATTO

Brachelente Chiara¹, Wiener Dominique², Malik Yasmina³, Huessy Daniela⁴, Capuccini Silvia¹,
Mechelli Luca¹

¹ Dipartimento di Scienze Biopatologiche ed Igiene delle Produzioni Animali e Alimentari, Facoltà di
Medicina Veterinaria, Università di Perugia, Italia

² Istituto di Patologia Animale, Facoltà Vetsuisse, Università di Berna, Svizzera

³ Clinica dei Piccoli Animali, Facoltà Vetsuisse, Università di Berna, Svizzera

⁴ Istituto di Batteriologia Veterinaria, Facoltà Vetsuisse, Università di Berna, Svizzera

Un gatto europeo, femmina, di 4 anni, è stato sottoposto a visita medica in seguito ad episodi ricorrenti di costipazione. Al momento del ricovero, l'animale presentava tachicardia, disidratazione e dolorabilità addominale con feci palpabili nel colon discendente. A causa dello sviluppo di una ipertermia febbrile e di un'eruzione cutanea correlata alla presenza del catetere endovenoso, si era proceduto alla rimozione dello stesso. Il giorno seguente, numerose lesioni cutanee dolorose erano comparse nella regione ventrale dell'addome e nella faccia interna delle cosce. La cute colpita era eritematosa e il tessuto sottocutaneo fortemente edematoso. Le condizioni generali erano rapidamente peggiorate, portando a morte l'animale. All'esame istopatologico di campioni cutanei si osservava la presenza di una grave necrosi a tutto spessore della cute e del sottocute e di una vasculite settica associata a numerosi batteri gram negativi. I risultati degli esami batteriologici effettuati su campioni di fegato, rene e milza, confermavano la diagnosi di una sepsi da *Acinetobacter baumannii*. L'identificazione tramite PCR del gene *bla*_{OXA-51-like} specifico per *A. baumannii* realizzata retrospettivamente sui campioni di cute rilevava la presenza di *Acinetobacter* anche nelle lesioni cutanee. Sulla base del quadro clinico e dei reperti anatomico-istopatologici è stata quindi formulata una diagnosi di fascite necrotizzante associata a sindrome da shock tossico. La fascite necrotizzante rappresenta un'infezione batterica fulminante, rapidamente progressiva e potenzialmente letale, che colpisce le porzioni profonde della cute e del tessuto sottocutaneo. Una fascite necrotizzante dovrebbe essere sospettata ed inclusa nell'ambito delle diagnosi differenziali in animali che presentano segni clinici caratterizzati da dolore intenso, ipertermia febbrile e segni di shock settico. Accanto agli agenti causali tradizionalmente descritti in letteratura, anche batteri gram negativi, ed in particolare *Acinetobacter baumannii*, devono essere considerati tra le diagnosi differenziali.

Parole chiave: gatto, fascite necrotizzante, shock tossico, *Acinetobacter baumannii*

A CASE OF NECROTIZING FASCIITIS WITH TOXIC SHOCK-LIKE SYNDROME IN A CAT CAUSED BY *ACINETOBACTER BAUMANNII*

A 4-year-old, female, domestic short-hair cat was presented due to recurrent episodes of constipation. At admission to the hospital, the cat showed tachycardia, dehydration and abdominal pain with palpable feces in the colon descendens. Due to the development of a febrile temperature and a cutaneous eruption following the intravenous catheterization, the catheter was removed. The following day, numerous painful skin lesions appeared in the ventral region of the abdomen and thighs, characterized by cutaneous erythema and subcutaneous edema. The general condition of the animal rapidly worsened and the cat died. The histopathological examination of skin samples showed the presence of a necrosis of epidermis and subcutaneous tissue with a septic vasculitis and intralesional gram negative bacteria. The bacteriological results of liver, kidney and spleen samples confirmed a sepsis due to *Acinetobacter baumannii*. The PCR identification of the gene *bla*_{OXA-51-like} specific for *A. baumannii* performed on paraffin embedded skin samples revealed the presence of *Acinetobacter* in the cutaneous lesions as well. According to the clinical picture and to the histopathological findings, a final diagnosis of necrotizing fasciitis with a toxic shock-like syndrome was made.

Key words: cat, necrotizing fasciitis, toxic shock, *Acinetobacter baumannii*

INFIAMMAZIONE XANTOGRANULOMATOSA DELL'INTESTINO TENUE IN UN CANE

Romanucci Mariarita, Malatesta Daniela, Guardiani Pierluigi*, Frescura Paolo*, Della Salda Leonardo

Dipartimento di Scienze Biomediche Compare, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Teramo

**Libero Professionista, Città Sant'Angelo, Pescara*

Un cane, Pit Bull, maschio, di 12 anni è stato sottoposto a visita clinica per la presenza di diarrea cronica resistente alla terapia medica. La laparotomia esplorativa ha evidenziato, sulla sierosa dell'intestino tenue ed a livello del mesentere, la presenza di noduli rilevati diffusi, di 2-3 mm di diametro, di colorito biancastro. All'esame istologico tali noduli, localizzati prevalentemente a livello della tonaca muscolare e della sierosa, apparivano caratterizzati da un accumulo di macrofagi schiumosi, con citoplasma ampio, finemente vacuolizzato, associati ad aree di necrosi, emorragie, deposito di cristalli di colesterolo, infiltrazione di granulociti neutrofili, aggregati linfoplasmacellulari e rari elementi multinucleati. Si rilevavano inoltre dilatazione dei vasi linfatici ed infiltrazione linfoplasmacellulare a carico della mucosa. Le colorazioni PAS, Grocott, Ziehl-Neelsen, Giemsa e Gram non hanno evidenziato la presenza di microrganismi, mentre la colorazione con Oil Red O ha dimostrato la presenza di lipidi all'interno del citoplasma dei macrofagi. Sulla base di tali risultati è stata formulata una diagnosi di infiammazione xantogranulomatosa dell'intestino tenue, la quale rappresenta una rara forma di infiammazione cronica, ben documentata nell'uomo a livello del rene e della colecisti, ma raramente descritta anche a carico del colon. Per nostra conoscenza, essa non risulta invece segnalata nella specie canina. I meccanismi patogenetici proposti comprendono infezioni da agenti a bassa virulenza, disordini immunologici, alterazioni nel trasporto dei lipidi, ostruzione linfatica. Nel presente caso, l'enterite linfoplasmacellulare associata a linfangectasia intestinale permettono di ipotizzare il coinvolgimento di un ostacolo al drenaggio linfatico nella genesi delle lesioni xantogranulomatose.

Parole chiave: infiammazione xantogranulomatosa, intestino tenue, cane

XANTHOGRANULOMATOUS INFLAMMATION OF THE SMALL BOWEL IN A DOG

A 12-year-old male American Pit Bull Terrier was presented with chronic diarrhea unresponsive to therapy. Laparotomy evidenced disseminated whitish nodules 2-3 mm in diameter on serosal surface of small bowel, as well as on mesenteric tissue. Histopathological examination revealed nodular collection of foamy histiocytes, with large finely vacuolated cytoplasm, associated with necrotic areas, haemorrhages, presence of cholesterol clefts, variable numbers of neutrophils, lymphocytes, plasma cells and rare multinucleated giant cells. Such nodules mainly involved serosal and muscular layers. Diffuse dilation of lymphatic vessels, as well as mucosal lymphoplasmacytic inflammation were also observed. PAS, Grocott, Ziehl-Neelsen, Giemsa and Gram stains failed to detect microorganisms, while Oil Red O stain showed lipid-filled vacuoles in the cytoplasm of histiocytes. On the basis of the above results, a diagnosis of xanthogranulomatous inflammation of the small bowel was made. It represents an uncommon form of chronic inflammation, well-recognized in human kidney and gallbladder, but rarely involving human large bowel. To our knowledge, such process has not yet been described in the dog. Proposed pathogenetic mechanisms include infection by low-virulence organisms, immunological disorders, defective lipid transport and lymphatic obstruction. In our case, lymphoplasmacytic enteritis associated with lymphangectasis suggest a component of lymphatic obstruction in the pathogenesis of the xanthogranulomatous lesions.

Key words: xanthogranulomatous inflammation, small bowel, dog

COLESTEATOMA INTRACRANICO IN UN GATTO

Ricci Emanuele, Abbiati Gianluca*, Salvadori Claudia, Arispici Mario, Cantile Carlo

Dipartimento di Patologia Animale Profilassi e Igiene degli Alimenti – Università di Pisa

**Clinica Veterinaria Malpensa – Samarate (VA)*

Sono descritte le caratteristiche cliniche e morfologiche di un colesteatoma intracerebrale in un gatto comune europeo, maschio, di 4 anni d'età affetto da progressiva atassia, debolezza e dolorabilità del treno posteriore da circa 5 mesi. Il profilo biochimico ha rivelato una lieve ipercolesterolemia (236 mg/dl, intervallo normale: 97-207 mg/dl). La risonanza magnetica ha evidenziato la presenza di una voluminosa massa solida espansiva in sede extra-assiale nella regione mediana interemisferica. La lesione era ipointensa nelle immagini T1 pesate e isointensa nelle T2 pesate. All'esame necroscopico è stata osservata una voluminosa neoformazione espansiva a carico dell'emisfero cerebrale destro, estesa dall'area mediale del lobo frontale destro alla regione temporo-occipitale. Al taglio appariva rotondeggiante del diametro massimo di 22 mm, compatta, di consistenza soda, di colore giallo-arancio, con aree diffuse di colore grigio-biancastro o diafane e piccole aree emorragiche multifocali. La neoformazione comprimeva le strutture diencefaliche e talamiche di entrambi gli emisferi, senza tendenza ad infiltrare il neuroparenchima. Istologicamente la neoformazione risultava ben circoscritta, non incapsulata, formata da un massivo accumulo di voluminosi macrofagi con citoplasma schiumoso, istiociti multinucleati, associati alla deposizione di cristalli aghiformi di colesterolo. Il granuloma era circoscritto da un sottile e uniforme strato leptomeningeo e, in considerazione della sua localizzazione, è stato possibile ipotizzarne l'origine dalle strutture meningehe del solco del corpo calloso di destra. Il colesteatoma intracranico è un'entità patologica ben conosciuta nel cavallo, mentre solo sporadiche segnalazioni sono state riportate nel cane, nei suricati e negli anfibi. In letteratura esiste un'unica segnalazione nel gatto.

Parole chiave: gatto, colesteatoma, risonanza magnetica, sistema nervoso centrale

INTRACRANIAL CHOLESTEROL GRANULOMA IN A CAT

The clinical and pathological features of a cerebral cholesterol granuloma in a cat are described. A 4 years-old neutered male European breed cat was presented with a 5-month history of progressive neurological deficits characterized by weakness, ataxia and pain perception in the hindlimbs. Haematological and biochemical profiles revealed a slight hypercholesterolemia (236 mg/dl, normal range: 97-207 mg/dl) and magnetic resonance imaging showed an extra-axial mass, inhomogeneous after contrast enhancement. At post-mortem examination, a large mass extended from the right frontal lobe to the temporo-parietal region and caused flattening of cerebral gyri and compression of thalamic and diencephalic regions. On the cut surface, a well-circumscribed, orange-yellow mass of 22 mm diameter was evident. The histological pattern consisted of abundant cholesterol cleft deposits surrounded by many foamy macrophages and multinucleated giant cells. A thin continuous layer of leptomeningeal tissue completely circumscribed the mass and the surrounding neuroparenchyma showed gliosis and neuronal loss. On the basis of the localization of the mass, we hypothesized that the granuloma originated from the meningeal structures of the right supra-callosal sulcus. Intracranial cholesterol granulomas have mostly been reported in horses and only sporadically in dogs, meerkats and amphibians. Only one case has been reported in cats.

Key words: cat, cerebral cholesteatoma, MRI, central nervous system

APPLICAZIONE DELLA CLASSIFICAZIONE NATIONAL HEALTH SERVICE BREAST SCREENING PATHOLOGY (NHSBS) NELLA COMPARAZIONE CITO-ISTOLOGICA DEI TUMORI MAMMARI DELLA CAGNA

Antuofermo Elisabetta,¹ Rocca Stefano¹, Burrai Giovanni¹, Pirino Salvatore¹, Castiglia Paolo², Marras Vincenzo³

¹Dipartimento di Patologia e Clinica Veterinaria. Facoltà di Medicina Veterinaria.

²Istituto di Patologia ed Igiene

³Istituto di Anatomia e Istologia Patologica. Facoltà di Medicina e Chirurgia. Università degli studi di Sassari.

I tumori mammari della cagna (CMT) rappresentano più del 52% di tutte le neoplasie osservate in questa specie. La citologia agoaspirativa (FNAC) è ritenuta una metodica veloce, poco costosa e soprattutto ben tollerata dagli animali. Sino ad oggi però, solamente pochi lavori hanno considerato valida questa tecnica applicata ai CMT. Le difficoltà diagnostiche, prevalentemente legate alla eterogeneità dei quadri della neoplasia, hanno spesso portato ad una diagnosi inefficace. L'elevata specificità della citologia agoaspirativa, dimostra l'efficacia della stessa nella diagnosi del tumore mammario nella donna. L'obiettivo del presente lavoro è stato quello di valutare l'applicabilità della classificazione NHSBS e la concordanza tra FNAC ed istopatologia nella diagnosi dei CMT. Inoltre abbiamo voluto testare l'efficacia della colorazione E&E nella citologia dei CMT. Sono stati esaminati 75 agoaspirati provenienti da 41 cagne con tumore mammario utilizzando la classificazione NHSBS, basata solamente sulla valutazione delle caratteristiche citonucleari delle cellule epiteliali e che raggruppa le neoplasie mammarie in cinque categorie: C1 (inadeguata), C2 (benigna), C3 (atipica ma probabilmente benigna), C4 (sospetta di malignità), C5 (sicuramente maligna). Per ogni campione citologico è stato eseguito, come gold standard, l'esame istologico nella stessa area di prelievo. Delle 75 neoplasie, 3 sono state escluse dal presente lavoro perché costituite di sola componente stromale. 72 neoplasie sono state così classificate: C1(3/72), C2(7/72), C3 (38/72), C4(15/72), C5(9/72). All'esame istologico 3 neoplasie sono state classificate come benigne e 34 come maligne. Con la classificazione NHSBS la diagnosi citologica è risultata sovrapponibile a quella istologica nel 94,4% dei casi. Tali risultati, seppure preliminari, incoraggiano l'uso della classificazione NHSBS nella diagnosi citologica dei CMT. La colorazione con EE si è rivelata molto più efficace nella distinzione dei dettagli cellulari rispetto alla MGG, utilizzata generalmente in citologia veterinaria

Parole Chiave: Cane, agoaspirato, tumori mammari

NHSBS CLASSIFICATION USE IN THE CORRELATION OF CANINE MAMMARY TUMOUR CYTOLOGY AND HISTOPATHOLOGY

Canine mammary tumours (CMT) are the most common neoplasia in bitches. Fine needle aspiration cytology (FNAC) is a fast and inexpensive technique well-tolerated by animals. Few reports have shown how difficult cytological diagnosis of CMT is and how difficult benign or malignant tumours are to classify using FNAC. Cytological diagnosis has often been inconclusive in veterinary pathology. In the diagnosis of human breast cancer, FNAC efficacy is beyond doubt due to its high specificity. In this preliminary study, our aim is to evaluate the efficacy of NHSBS classification, applied to CMT. Secondly, we wish to test the usefulness of H&H stain in FNAC for CMT diagnosis. 75 FNAC specimens, from 41 dogs with mammary tumours were examined. 72/75 underwent the NHSBS classification. Histological examination of the tumours was performed in each case for comparison purposes. All the CMTs fell under the five categories: C1 (3 cases), C2 (7 cases), C3 (38 cases), C4 (15 cases), C5 (9 cases). As regards H&H staining in our view it was more efficacious than M.G.G. staining in distinguishing morphological cell details. Our results showed that the NHSBS classification gave a 94.4% correspondence level between cytological and histological findings.

Key words: Dog, fine needle aspiration cytology, mammary tumors

STUDIO DELLE LESIONI INTRAEPITELIALI MAMMARIE (IELS) NEL CANE. UN VALIDO MODELLO PER LO STUDIO DEL CANCRO ALLA MAMMELLA DELLA DONNA

**Antuofermo Elisabetta¹, Pirino Salvatore¹, Burrai Giovanni¹, Miller Margaret², Badve Sunil³,
Mohammed Sulma²**

¹*Dipartimento di Patologia e Clinica Veterinaria. Università degli studi di Sassari*

²*Department of Comparative Pathobiology. Purdue University, West Lafayette, IN.*

³*Department of Pathology, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, IN*

Le lesioni intraepiteliali mammarie non invasive (IELS) vengono rilevate con maggiore frequenza nella donna con l'uso del metodo di screening mammografico. La presenza delle IELS, come l'iperplasia duttale, l'iperplasia duttale atipica e il carcinoma duttale *in situ* vengono riconosciute quali fattori di rischio per l'insorgenza del carcinoma mammario invasivo nella donna. Non esiste un valido modello animale che mostri l'insorgenza spontanea delle IELS e dei tumori mammary. Questo studio, per la prima volta, descrive e confronta i quadri istologici e immunoistochimici delle IELS della cagna e della donna al fine di valutare se questa specie possa costituire un valido modello animale per lo studio del cancro alla mammella della donna. Sono state utilizzate 212 biopsie di tumore mammario per valutare la presenza delle IELS e dei tumori ad esse associate. Sono state individuate 60/212 IELS nel tessuto circostante la neoplasia e classificate come adenosi, papilloma intraduttale, papilloma sclerosante, iperplasia duttale (UH), iperplasia duttale atipica (ADH) e carcinoma duttale in situ (DCIS). La maggior parte delle lesioni proliferative non mostranti atipie sono risultate associate a tumori mammary benigni mentre quelle mostranti atipia (ADH, DCIS) si sono rivelate associate ai tumori maligni. L'espressione estrogenica era significativamente diminuita nell'iperplasia duttale atipica e nel DCIS rispetto all'iperplasia duttale e al tessuto sano. L'espressione per l'erbB-2 e il Ki67 era significativamente maggiore nel DCIS alto grado rispetto al tessuto sano, all'iperplasia duttale e al DCIS basso grado. L'aspetto morfologico e la risposta immunofenotipica delle IELS sono risultate notevolmente simili a quelle osservate nella donna. Dai dati in nostro possesso, seppure preliminari, ci sentiamo di sostenere che la cagna costituisce un valido modello animale non solo per lo studio della progressione e dell'invasione del cancro alla mammella della donna ma anche per la prevenzione ed il trattamento dello stesso.

Parole chiave: tumore mammario, cagna, carcinoma *in situ*, lesioni preneoplastiche

SPONTANEOUS MAMMARY INTRAEPITHELIAL LESIONS IN DOGS: A MODEL FOR BREAST CANCER

Noninvasive mammary intraepithelial lesions (IELs) in humans are detected with increasing frequency because of routine mammographic screening. The presence of IELs may herald increased risk of developing invasive breast carcinoma in women. An animal model is needed to study breast cancer and spontaneous IELS. This study describes the histologic and immunohistochemical similarity between human and canine IELS. 60/212 IELS were found and categorized as adenosis, sclerosing adenosis, intraductal papilloma, sclerosing papilloma, ductal hyperplasia, atypical ductal hyperplasia, and ductal carcinoma *in situ* (DCIS). IELS without atypia were associated with benign tumors, whereas IELS with atypia were associated with mammary cancer. Estrogen receptor- α expression was significantly diminished in atypical ductal hyperplasia and DCIS in comparison to usual ductal hyperplasia. HER-2 and Ki67 expressions were significantly higher in high-grade DCIS than in healthy tissue. Canine mammary IELS were strikingly similar to those of the human breast. IELS frequency in dogs, their association with spontaneous mammary cancer, their estrogen receptor and HER-2 expression, and their histologic resemblance to human IELS may make the dog an ideal model to study human breast cancer.

Key words: breast cancer, bitch, carcinoma *in situ*, preneoplastic lesions.

I MASTOCITI NELLA GHIANDOLA MAMMARIA DEL CANE: ESISTE UNA CORRELAZIONE CON LA PROGRESSIONE NEOPLASTICA?

Sfacteria Alessandra, Mazzullo Giuseppe, Macri Battesimo

Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria, Sezione di Patologia Generale e Anatomia Patologica, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Messina

I mastociti (MC) sono caratterizzati da granuli secretori specializzati contenenti molecole biologicamente attive quali citochine, fattori di crescita e proteasi, che sono rilasciate in seguito ad attivazione della cellula. Per tale motivo hanno un riconosciuto ruolo primario nell'anafilassi, infiammazione, angiogenesi, degradazione della matrice extracellulare, cicatrizzazione e fibrosi. Da tempo i MC sono stati evidenziati anche nello stroma di diversi istotipi tumorali sebbene non sia chiaro se si tratti di una presenza casuale, benefica o dannosa nei confronti della neoplasia. Nel presente studio 25 campioni di ghiandola mammaria di cane (5 ghiandole normali, 5 iperplasie/displasie, 15 carcinomi) sono stati primariamente sottoposti ad immunistochemica per la valutazione della presenza, numero e distribuzione dei mastociti. I MC sono stati contati e statisticamente analizzati; successivamente è stata presa in considerazione anche la positività a molecole coinvolte nell'angiogenesi e nella progressione neoplastica quali Epo e il suo recettore, MMP-9 e TNF- α . I risultati dimostrano che i MC sono una popolazione cellulare ben rappresentata nelle lesioni preneoplastiche e neoplastiche della ghiandola mammaria e che, per numero, distribuzione nella lesione e immunoreattività, potrebbero essere correlati alla crescita e alla progressione neoplastica.

Parole chiave: mastociti, immunistochemica, cane, ghiandola mammaria, neoplasia

MAST CELLS IN CANINE MAMMARY GLAND: IS THERE A ROLE IN TUMOUR PROGRESSION?

Mast cells (MCs) are specialized secretory cells that, once activated, are able to release biomolecules such as cytokines, growth factors and proteases. MCs are well known for their role in type I hypersensitivity reactions, inflammation, angiogenesis, extracellular matrix degradation, wound healing and fibrosis. Moreover, MCs are often described in association with several human tumors although it is not clear if they can benefit or inhibit the neoplasm or if they are only innocent bystanders. In the present paper 25 samples of canine mammary gland (5 normal gland, 5 hyperplasia/dysplasia, 15 carcinoma) underwent IHC for evaluation of presence, number and distribution of MCs. MCs were counted and statistically analyzed. Furthermore, the positivity for Epo/EpoR complex, MMP-9 and TNF- α was evaluated.

Our findings demonstrate that MCs are well represented cells in preneoplastic and neoplastic lesions of canine mammary gland. The number and distribution of MCs could be related to neoplastic growth and progression.

Key words: mast cells, immunohistochemistry, dog, mammary gland, neoplasia

ESPRESSIONE DI VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR NEL CARCINOMA INFIAMMATORIO MAMMARIO DELLA CAGNA

Millanta F., Ressel L., Citi S.*, Caneschi V., Poli A.

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

Il carcinoma mammario infiammatorio della cagna è la forma più aggressiva di tumore spontaneo della ghiandola mammaria in questa specie ed è ritenuto un valido modello animale per lo studio del carcinoma infiammatorio del seno. Lo scopo del nostro studio è stato di valutare il fenomeno angiogenetico in carcinomi infiammatori mammari di cagna tramite l'espressione di Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). L'espressione di VEGF nei carcinomi infiammatori è inoltre stata confrontata con l'espressione della stessa citochina in tumori mammari infiltranti non infiammatori. Diciassette casi di carcinoma infiammatorio e 27 carcinomi mammari infiltranti sono stati esaminati per la valutazione immunohistochimica dell'espressione di VEGF, di HER-2, del recettore per estrogeno (ER) e di quello per il progesterone (PR). VEGF è risultato espresso nel 100% dei carcinomi infiammatori. La totalità dei carcinomi infiammatori è risultata negativa per l'espressione di ER e PR. L'overespressione di HER-2 è stata riscontrata nel 65% dei casi esaminati. Un'aumentata espressione di VEGF non è risultata correlata con una overespressione di HER-2. L'espressione di VEGF è risultata significativamente più elevata nei carcinomi infiammatori rispetto ai carcinomi infiltranti ($P=0.02$). I risultati ottenuti confermano il fenotipo particolarmente aggressivo del carcinoma infiammatorio e suggeriscono che VEGF potrebbe essere responsabile dell'elevato potenziale angiogenetico di tale neoplasia.

Parole chiave: VEGF, carcinoma infiammatorio, ghiandola mammaria, cane

EXPRESSION OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR IN CANINE INFLAMMATORY MAMMARY CARCINOMAS

The inflammatory mammary carcinoma (IC) is the most aggressive type of mammary cancer in the canine species and a reliable spontaneous animal model for the human inflammatory breast cancer. The aim of our study was to investigate the angiogenetic process in canine ICs by the assessment of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) expression and to evaluate statistical correlations among this and some parameters of prognostic significance. For a comparison, VEGF expression was also investigated in canine invasive mammary carcinomas (IMCs). Sixteen canine ICs and 27 IMCs were studied. VEGF, estrogen-(ER), progesteron receptor (PR), and HER-2 expression were assessed by immunohistochemistry. VEGF was expressed in 100% cases of canine ICs. All the ICs were ER- and PR-negative. HER-2 overexpression was observed in 11/17 (65%) cases and was not associated to an increase of VEGF positive neoplastic cells. VEGF expression was significantly higher in ICs than IMCs ($P=0.02$). The results of our preliminary study confirm that canine ICs is a particularly aggressive type of canine mammary carcinoma and suggest that VEGF may contribute to the high angiogenic phenotype of these tumors.

Key words: VEGF, inflammatory mammary carcinoma, mammary gland, dog

L'ONCOGENE MET NELL'OSTEOSARCOMA CANINO: STUDIO DI UN MODELLO PER LO SVILUPPO DI TERAPIE GENICHE INNOVATIVE

De Maria¹ Raffaella , Miretti Silvia ², Iussich Selina ¹, Olivero Martina ², Levine Roy ³, Buracco Paolo ¹
Di Renzo Maria Flavia², Biolatti Bartolomeo ¹

¹Department of Animal Pathology, School of Veterinary Medicine, University of Torino, Grugliasco (Turin), Italy

²Laboratory of Cancer Genetics of the Institute for Cancer Research and Treatment (IRCC), University of Torino School of Medicine, Candiolo (Turin), Italy

³Department of Molecular Medicine, College of Veterinary Medicine, Cornell University, Ithaca, NY

I tumori spontanei negli animali domestici rappresentano un ottimo modello per lo studio e l'applicazione di terapie innovative nel tumore umano. L'osteosarcoma canino (OSA) presenta caratteristiche istologiche e cliniche simili a quelle dell'osteosarcoma che colpisce l'uomo dove l'oncogene MET risulta overespresso nell'80% dei casi ed è considerato un fattore prognostico negativo.

Scopo di questa ricerca è stato quello di studiare il livello di espressione dell'oncogene MET nell'osteosarcoma di cane e di valutare attraverso saggi biologici *in vitro* il suo ruolo biologico nell'invasione dei tessuti.

In questo studio abbiamo dimostrato che l'oncogene MET è over-espresso in 6/6 linee di osteosarcomas canino (CO2, CO3, CO7, CO8, D22 and D17) di cui 3 presentano un cambiamento aminoacidico a livello del dominio transmembrana del recettore. Dati immunohistochimici hanno invece rivelato che il 74% casi overesprimono MET. Saggi *in vitro* eseguiti attraverso la tecnica dei trans-well in presenza o in assenza di matrigel hanno dimostrato che le cellule D22 e D17 sono in grado spontaneamente di invadere e attraversare la membrana e la loro capacità di invasione si riduce se queste cellule vengono trasdotte stabilmente con siRNA specifici (interfering short hairpin RNAs) per MET canino mediante l'utilizzo di vettori Lentivirali. Questi dati dimostrano che l'oncogene MET svolge un ruolo fondamentale nella patogenesi dell'osteosarcoma canino e che questo tumore può essere considerato un modello utile per lo sviluppo di terapie geniche contro l'osteosarcoma umano.

Parole chiave: Cane, osteosarcoma, oncogene, terapia genica

SPONTANEOUS CANINE OSTEOSARCOMA AS A MODEL TO DEVELOP MET TARGETED THERAPIES AGAINST HUMAN OSTEOSARCOMA

Companion animal spontaneous tumors are suitable models for human cancer, primarily because both the animal population and the tumors are genetically heterogeneous. Human and canine OSA shares histopathological and clinical features. We studied the canine orthologue of *MET*, a tyrosine kinase oncogene, which is aberrantly expressed in human OSA, where it is an important prognostic marker and is sought as a therapeutic target. The canine *met* oncogene is 91% similar to the human *MET*, is highly expressed in 6/6 canine OSA cell lines (CO2, CO3, CO7, CO8, D22 and D17) and is mutated in 3 of them. High level of expression was also measured in 79% of 34 samples of primary tumors and metastases from various breeds, by using immuno-histochemistry. *met* over-expressing canine OSA cells showed elevated spontaneous motility and invasiveness, which was impaired in cells transduced to stably express *met*-specific interfering short hairpin RNAs, by means of Lentiviral vectors. These data show that *met* over-expression qualifies canine OSA as homologous to the human counterpart and as a suitable model to test *MET* targeted therapies of metastasizing OSA. This is particularly important for human OSA, which is frequent in children and adolescents, where novel therapies cannot be tested.

Key words: Dog, osteosarcomas, oncogene, gene therapy

SISTEMI INFORMATIVI GEOGRAFICI IN ONCOLOGIA VETERINARIA

Paciello Orlando ^a, De Leo Marcello ^a, Musella Vincenzo ^a, Papparella Serenella ^a

^a Dipartimento di Patologia e Sanità animale - Università degli Studi di Napoli Federico II, via Delpino, 1, 80137 Napoli, Italia

Geographical Information System (GIS) è un sistema informativo computerizzato che permette l'acquisizione, l'analisi e la visualizzazione di informazioni derivanti da dati geografici (geo-referenziati). Nella Sanità Pubblica, i GIS possono contribuire alla prevenzione, alla sorveglianza, al controllo, e alla conoscenza della distribuzione dell'incidenza o della prevalenza di malattie. I GIS permettono un'analisi dei fenomeni sanitari sia per specifici territori, con limiti amministrativi (comuni, ASL, distretti, etc.) o con limiti definiti in base ai rischi, sia per tipologia di utenti o pazienti (per sesso, classi di età, classi sociali, etc.). Proprio per una patologia polifattoriale come quella neoplastica è evidente che i GIS, con le analisi spaziali dei dati ambientali, offrono l'opportunità di trarre spunti per ulteriori approfondimenti da sviluppare con tecniche di epidemiologia analitica. Inoltre la raffigurazione su mappa risulta estremamente informativa perché permette di cogliere, a colpo d'occhio, la differente distribuzione della malattia nelle diverse aree del territorio e permette una visualizzazione globale del fenomeno sanitario rendendo molto più facile stabilire le relazioni causa-effetto.

Normalmente, i dati raccolti in seguito ad attività routinarie o ad indagini dedicate, vengono riassunti e rappresentati sottoforma di tabelle, la cui lettura ed interpretazione risulta spesso laboriosa. In quest'ottica, utilizzando i GIS abbiamo cercato di studiare la distribuzione geografica dei tumori dei cani in Campania. I dati analizzati con i GIS riguardano 2.618 casi di tumori di cani distribuiti in 143 Comuni della regione Campania. Inoltre sono state allestite delle mappe di distribuzione dei tumori per sede di insorgenza e per istotipo rilevando i patterns di distribuzione spaziale. Il confronto di questi dati sanitari con dati ambientali definiti ci permetterà di individuare fattori di rischio ambientali. In futuro verranno sviluppati dei modelli predittivi circa l'incidenza, nello spazio e nel tempo, dei tumori, anche in relazioni a variazioni climatiche e caratteristiche ambientali nonché alle caratteristiche dell'area interessata.

Parole chiave: Sistemi Informativi Geografici, Oncologia Veterinaria, monitoraggio ambientale

GEOGRAPHIC INFORMATION SYSTEM IN VETERINARY ONCOLOGY

Geographic Information System (GIS) are computerized systems consisting of hardware, software, data and people for collecting, storing, managing, interrogating and displaying spatially referenced (geo-referenced) data. A GIS is created by linking standard computer database "attributes" to map features represented as layered point, line or polygon "vector" or to map features represented as digital "raster" image data pixels. The development of methods for mapping diseases are important tasks to study the geographical distribution of disease, the patterns of distribution, the causal – ecological – factors of these patterns.

The aims of the present study was to develop a GIS forecast and risk assessment model for veterinary oncology. We used GIS to analyse the distribution of 2.618 canine tumours in 143 Municipalities of the Campania Region (Italy). We performed distribution maps of the different histotypes and localization in the body. The use of these technologies permits a rapid assessments of disease distributions. Maps depicting the geographic variation of cancer can provide important clues for cancer control and prevention, as well as for cancer aetiology.

In conclusion by GIS, we would develop predictive models about the incidence of tumours correlating with environmental and geographic data.

Key words: Geographic Information System, Veterinary Oncology, environmental monitoring

CARATTERIZZAZIONE CLINICA, MORFOLOGICA ED IMMUNOISTOCHEMICA DEI TUMORI PERIVASCOLARI DEL CANE

Avallone Giancarlo*, Caniatti Mario*, Stefanello Damiano[§], Chiara Palmieri, Roccabianca Paola***

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

[§]Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Milano.

*** Dipartimento di Scienze Biomediche Comparate-Sezione Patologia Generale e Anatomia Patologica Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli studi di Teramo.*

I tumori perivascolari (TPV) sono neoplasie che derivano dalle cellule della parete vasale ad eccezione dell'endotelio. Il gruppo dei TPV cutanei dell'uomo include il tumore dei glomi, l'emangiopericitoma (EP), il miopericitoma (MPC), l'angioleiomioma/sarcoma, l'angiomiofibroblastoma e l'angiofibroma. Nel cane i soli TPV descritti attualmente sono l'EP, l'angioleiomioma/sarcoma ed il tumore dei glomi. Lo scopo di questo studio è stato di caratterizzare i TPV cutanei del cane. Sono stati raccolti 20 tumori con citologia suggestiva di EP. La diagnosi definitiva è stata formulata sulla base dell'associazione tra modelli istologici tipici dei TPV (*staghorn*, placentoidi, vortici perivascolari, fasci dalla tonaca media) e reattività dei tessuti congelati all'esame immunohistochimico con un pannello di 22 anticorpi tra cui 7 marker muscolari ed il 3G5, anticorpo che riconosce un ganglioside di membrana espresso dai periciti dermici dell'uomo. I cani, 12 maschi e 8 femmine, di età compresa tra 6 e 13 anni, presentavano tutti lesioni singole più frequenti a sede acrale (10/20). In base all'esame istologico ed immunohistochimico sono stati diagnosticati 6 MPC, 5 angioleiomiomi, 2 angioleiomiosarcomi, 2 EP, 1 angiofibroma ed 1 tumore avventiziale. Una diagnosi definitiva non è stata possibile in 3 casi. Smoothelina, caldesmona, desmina, miosina, calponina e 3G5 si sono rivelati i marker più utili ai fini diagnostici. In parallelo a quanto riscontrato nell'uomo, l'EP canino sembra essere un tumore raro ed aggressivo. È inoltre evidente che le neoplasie fino ad ora definite come EP non costituiscono una singola entità patologica ma comprendono uno spettro più ampio di TPV. Prima di raggruppare i TPV in un'unica categoria, è necessaria una classificazione precisa associata ad una caratterizzazione prognostica adeguata.

Parole chiave: cane, tumori perivascolari, emangiopericitoma, miopericitoma

CLINICAL, MORPHOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF CANINE PERIVASCULAR WALL TUMORS

Perivascular wall tumors (PWT) are neoplasms arising from mural cells of blood vessels excluding the endothelial lining. Human cutaneous PWT comprise glomus tumor, hemangiopericytoma (HEP), myopericytoma (MPC), angioleiomyoma/sarcoma, angiomiofibroblastoma and angiofibroma. On the contrary PWT described in dogs are HEP, angioleiomyoma/sarcoma and glomus tumor. The purpose of this study was to characterize canine cutaneous PWT. Twenty cases with cytology suggestive of HEP were included. Diagnosis was based on vascular histological growth patterns (*staghorn*, placentoid, perivascular whorling, bundles from media) and immunohistochemistry utilizing 22 markers, including 7 smooth muscle markers and the cell surface ganglioside recognized by 3G5 (CSG-3G5). All cases were single lesions with frequent acral location (10/20). Six MPC, 5 angioleiomyomas, 2 angioleiomyosarcomas, 2 HEP, 1 angiofibroma and 1 adventitial tumor were identified. A definitive diagnosis was not possible in 3 cases. Smoothelin, caldesmon, desmin, myosin, calponin and 3G5 were the most valuable markers for the differential diagnosis of canine PWT. Similar to reports in man, canine HEP seems to be an uncommon and aggressive tumor. Prior to group canine PWT into one prognostic category an accurate classification and prognostic characterization seem necessary.

Key words: dog; perivascular wall tumors; hemangiopericytoma; myopericytoma

VALUTAZIONE DEL RIARRANGIAMENTO GENICO DEI RECETTORI ANTIGENICI IN CORSO DI NEOPLASIE EMATOPOIETICHE CANINE

Gelain M.E., Di Gravio S., Comazzi S.

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

I progressi nella caratterizzazione molecolare delle neoplasie ematopoietiche hanno permesso lo sviluppo di tecniche diagnostiche sempre più sensibili nell'identificare una popolazione clonale di cellule. In medicina veterinaria, la PARR (PCR for Antigen Receptor Rearrangement) è stata usata per confermare la diagnosi di neoplasie linfoidi, per stadare queste neoplasie e identificare l'origine B o T delle cellule neoplastiche nei casi in cui l'immunofenotipo non era conclusivo. In medicina umana però, sono stati segnalati casi di neoplasie linfoidi con fenotipo B o T che presentavano riarrangiamenti monoclonali per entrambe le linee cellulari. Inoltre anche leucemie mieloidi hanno evidenziato riarrangiamenti per i geni codificanti il TCR e IgH. Scopo di questo lavoro è stato quindi quello di analizzare il riarrangiamento genico in casi di neoplasie linfoidi con caratteristiche immunofenotipiche "aberranti" o con fenotipo non conclusivo e valutare se, in questi casi l'uso della PARR può essere conclusivo. Inoltre si è indagata la possibilità che anche neoplasie non linfoidi possano andare incontro ad un riarrangiamento per i geni codificanti il TCR e le IgH. Sono stati analizzati casi di neoplasie ematopoietiche nelle quali l'immunofenotipo ha evidenziato contemporanea presenza di antigeni rappresentativi di linee cellulari o stadi maturativi differenti, diminuzione nell'espressione degli antigeni panleucocitari, assenza di antigeni specifici della linea cellulare coinvolta, oltre a casi di neoplasie non-linfoidi. Sono stati selezionati 19 casi: 3 AUL, 3 ALL-B, 3 CLL-T, 5 linfomi, 2 AML, 1 sarcoma istiocitario disseminato, 1 timoma. Nei tre casi diagnosticati come leucemia acuta indifferenziata, la PARR ha evidenziato la presenza di un riarrangiamento clonale a carico del TCR, identificando quindi le cellule neoplastiche come cellule di origine T. In 5 casi è stato possibile evidenziare un doppio riarrangiamento. In particolare in 1 ALL-B, 1 CLL-T, 2 linfomi B e 1 linfoma T. Tra i casi di neoplasie non linfoidi, l'AML-7 è risultata positiva al riarrangiamento per il gene codificante le IgH e il caso di timoma ha evidenziato una positività al TCR. Questi risultati sembrano evidenziare come, anche a livello molecolare, così come già visto a livello fenotipico, le cellule neoplastiche possono presentare caratteristiche anomale o quadri comuni a più linee cellulari.

Parole chiave: PARR, neoplasie ematopoietiche, cane

INTRODUZIONE

I disordini linfoproliferativi sono neoplasie comuni nel cane per la cui diagnosi si rendono spesso necessarie tecniche diagnostiche avanzate che permettono la dimostrazione di una proliferazione clonale. Tra queste, la PARR (PCR for Antigen Receptor Rearrangements) consente di identificare il riarrangiamento dei geni della catena pesante e leggere delle Ig (IgH e IgL) per le neoplasie delle cellule B e del gene per la subunità β del TCR (T cell receptor) per le neoplasie delle cellule T^{1,2}. In medicina veterinaria, la PARR è stata usata per diagnosticare e stadare le neoplasie linfoidi^{3,4,5} e per identificare in modo sicuro l'origine B o T delle cellule neoplastiche⁶. In medicina umana però sono stati segnalati casi di "lineage infidelity" a livello molecolare, cioè neoplasie linfoidi con riarrangiamenti monoclonali sia per le Ig sia per il TCR in forme sia con fenotipo T sia B⁷. Inoltre anche leucemie mieloidi hanno rilevato riarrangiamento genico per TCR e IgH⁸. Scopo di questo lavoro è stato quindi quello di analizzare il riarrangiamento genico in casi di neoplasie linfoidi con caratteristiche immunofenotipiche definite "aberranti" o con fenotipo non conclusivo e valutare se, in questi casi di più difficile definizione della linea cellulare, l'uso della PARR può essere conclusivo. Inoltre si è indagata la possibilità che anche neoplasie non linfoidi possano andare incontro ad un riarrangiamento genico.

MATERIALI E METODI

Sono stati considerati casi di neoplasie linfoproliferative che, all'analisi citofluorimetrica, presentavano fenotipo aberrante, ossia: contemporanea presenza di antigeni di linee cellulari differenti (CD3+CD79a+, CD3+CD21+, CD4+CD8+); contemporanea presenza di antigeni riferibili a stadi maturativi diversi; diminuzione nell'espressione degli antigeni CD18 e CD45; assenza di espressione di antigeni specifici della linea cellulare coinvolta dalla proliferazione neoplastica. Sono stati inoltre considerati casi di leucemie linfoidi acute di origine B, in cui avevamo a disposizione materiale proveniente da tessuti diversi, e neoplasie non linfoidi per valutare le possibili diversità nei quadri riarrangiamento tra neoplasie con fenotipo "convenzionale" e aberrante. Sono stati selezionati 19 casi: 3 AUL, 3 ALL-B, 3 CLL-T, 6 linfomi, 2 AML, 1 sarcoma istiocitario disseminato, 1 timoma. Campioni di sangue periferico, midollo osseo, linfonodo sono stati utilizzati per l'estrazione di DNA, tramite kit commerciale (AllPrep DNA/RNA Mini Kit Qiagen). Il materiale ottenuto è stato quantificato con spettrofotometro NC-1000 e, per ciascun campione, sono stati usati 40-200 ng DNA in 20 μ L di reazione. Ogni campione è stato amplificato

con due set di primers per segmenti genetici codificanti per le Ig ed il TCR, come descritto da Burnett et al.⁹. I prodotti di PCR sono stati visualizzati su gel di agarosio e la reazione è stata considerata positiva quando erano individuabili una o più bande clonali dominanti ed è stata considerata negativa quando non era evidente una banda dominante o se erano presenti una serie di bande non dominanti. I campioni con risultato dubbio sono stati sottoposti ad heteroduplex (94°C per 5 minuti, 4°C per 1 ora).

RISULTATI

I tre casi di leucemia acuta indifferenziata hanno evidenziato una positività al riarrangiamento per il TCR ed è stato possibile quindi identificarle come ALL-T. In 1 dei 3 casi di leucemia linfocitica cronica con fenotipo aberrante (CD4+CD8+, CD3-) è stato invece possibile evidenziare un riarrangiamento a carico di entrambe i geni. Anche nei linfomi esaminati è stato possibile rilevare la presenza di doppi riarrangiamenti. In particolare, in un caso di linfoma centroblastico e di linfoma linfoblastico, entrambe con fenotipo CD21+CD79a+CD34+ e in un caso di linfoma pleomorfo a grandi cellule di origine T con fenotipo CD3+CD4+CD79a+. Nei casi di ALL-B, si sono evidenziati quadri diversi in tessuti diversi. In particolare, un caso ha evidenziato una positività per le IgH nel sangue periferico e una doppia positività in un linfonodo infiltrato dal processo neoplastico. Nel caso C78/05 invece il midollo osseo è risultato positivo al riarrangiamento per il TCR, un linfonodo ha dato esito positivo per le IgH, mentre il sangue periferico era negativo per entrambe. Tra i casi di neoplasie non linfoidi, un caso di AML-7 è risultato positivo al riarrangiamento per le IgH e il caso di timoma al TCR.

DISCUSSIONE

Nella nostro lavoro abbiamo potuto valutare come l'uso della PARR possa essere utilizzato per identificare la linea cellulare nei casi in cui l'analisi fenotipica non sia conclusiva. In particolare, nei tre casi diagnosticati come leucemia acuta indifferenziata caratterizzati dalla positività certa solo a marker panleucocitari e a CD34, la PARR ha evidenziato la presenza di un riarrangiamento clonale per il TCR, identificando quindi le cellule neoplastiche come cellule T. Rilievo interessante è stato la frequenza con cui nei nostri casi, se pur limitati nel numero, si è potuto identificare un doppio riarrangiamento. Questo quadro di riarrangiamento "aberrante" era presente in 5 sui 13 casi, diversi sia per linea cellulare coinvolta sia per lo stadio maturativo delle cellule neoplastiche. Infatti i 5 casi comprendevano una ALL-B, una CLL-T, un linfoma centroblastico B, un linfoma

linfoblastico B e un linfoma pleomorfo a grandi cellule T. In medicina umana la presenza di doppi riarrangiamenti sono stati osservati frequentemente nelle neoplasie ematopoietiche. La presenza di riarrangiamenti per il TCR sono particolarmente frequente nelle neoplasie a carico delle ALL-B¹⁰. Questo quadro è però segnalato anche nei tumori che coinvolgono le cellule più mature, come i linfomi, sia B sia T e in tutti i loro vari sottotipi⁷. Nei linfomi B questa situazione può essere spiegata dalla presenza di una popolazione di linfociti T benigni oligoclonali, segno di reattività verso la popolazione neoplastica B¹. Un'ulteriore spiegazione può essere data però anche dall'effettiva presenza di due distinte popolazioni neoplastiche o dalla presenza di un reale riarrangiamento a carico di entrambe i geni⁹. Quest'ultima ipotesi può essere alla base anche del particolare quadro fenotipico del caso di linfoma classificato come di origine T (CD3+CD4+), ma risultato positivo anche a CD79a. Nei casi di ALL da noi esaminati inoltre è stato possibile identificare quadri di riarrangiamento diverso in tessuti diversi. Lavori in medicina umana hanno suggerito la possibilità che il riarrangiamento genico in corso di neoplasia linfoide possa essere diverso a seconda del tessuto esaminato. Queste differenze possono essere date, sia dalla possibile espansione clonale limitata ad un particolare tessuto sia all'elevata sensibilità diagnostica della PCR capace di identificare un numero limitato di cellule linfoidi clonali all'interno di una popolazione policlonale¹¹. Quadri di riarrangiamento diversi in sangue e midollo osseo, sono state identificati in leucemie biclonali suggerendo la possibile formazione di un subclone nel comparto di origine¹². Nei casi di neoplasie non-linfoidi, un timoma e una AML-7 sono risultati positivi per il TCR e le IgH, rispettivamente. La diagnosi di timoma si basa sulla presenza di linfociti CD4+CD8+ per più del 10%. La differenziazione con il linfoma timico si basa, oltre che su una minor percentuale di linfociti CD4+CD8+ (<2%), anche sulla dimostrazione di un riarrangiamento clonale del TCR¹³. Recenti studi sul timoma nell'uomo hanno però segnalato la possibilità che alcune forme possano presentare riarrangiamenti a carico del TCR¹⁴. Non è da escludere quindi che estendendo questo tipo di analisi ad una casistica più ampia, anche nei timomi canini sia possibile identificare la presenza di una popolazione clonale di linfociti T. Per quanto riguarda il caso di AML-7, altri autori hanno segnalato la possibilità che leucemie mieloidi presentino riarrangiamenti per le IgH, avvalorando quindi l'idea che la PARR non sempre possa essere usata per assegnare le linee cellulari alle cellule neoplastiche⁹.

CONCLUSIONI

Nel nostro lavoro abbiamo valutato come l'uso della PARR possa essere utile, data la sua elevata sensibilità analitica, per individuare linfociti neoplastici in vari tessuti. Abbiamo però potuto evidenziare anche alcune problematiche di questa analisi, come la possibilità che tessuti diversi diano risultati diversi o l'eventualità che il medesimo campione risulti positivo sia al riarrangiamento per le IgH sia per il TCR, così come che anche neoplasie non linfoidi risultino positive alla PARR. Questi risultati sembrano confermare il fatto che, anche a livello molecolare, così come già visto a livello fenotipico, le cellule neoplastiche spesso evidenziano caratteristiche anomale o quadri comuni a più linee cellulari, contrariamente alla teoria secondo la quale, nelle neoplasie ematopoietiche, le cellule tumorali dovrebbero mantenere le caratteristiche della loro controparte normale. Le nostre analisi sembrano quindi confermare cioè che da tempo è consigliato in medicina umana, vale a dire il fatto che l'analisi molecolare dei geni codificanti i recettori linfocitari non deve essere considerata come un mezzo diagnostico "indipendente", ma un complemento all'esame clinico, morfologico e immunofenotipico.

BIBLIOGRAFIA

- 1- Van Dongen JJM et al. *Leukaemia*, 2003.
- 2- Gong J.Z. et al. *Am J Pathol.* 1999.
- 3- Vernau W. e Moore P.F. *Vet Immunol. Immunopath.* 1999.
- 4- Keller R.L. et al. *Vet Clin Path* 2004.
- 5- Lana S.E. et al. *J Vet Internal Med* 2006.
- 6- Wilkerson M.J. et al. *Vet Immunol Immunopathol*, 2005.
- 7- Garcia M.J. et al. *Diagnostic Molecular Pathology* 2001.
- 8- Schmidt C.A. e Przybylski G.K. *Int Rev Immunol* 2001.
- 9- Burnett R.C. et al. *Vet Path.* 2003.
- 10- Szczepanski T et al. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999.
- 11- Yokota S. et al. *Blood*, 1991.
- 12- Beishuzen A., et al. *Leukemia* 1992.
- 13- Lana et al. *J Vet Internal Med*, 2006.
- 14- Nakajima J et al. *Asian cardiovasc Thorac ann*, 2005.

Sample ID	diagnosi	IGH		TCR
		Major	Minor	
C110/05md	ALL-T (CD45+, CD34+)	-	-	+
C110/05sg	ALL-T (CD45+, CD34+)	-	-	+
C110/05vers	ALL-T (CD45+, CD34+)	-	-	+
C84/05sg	ALL-T (CD45+, CD34+)	-	-	+
C94/05sg	ALL-T (CD45+, CD34+)	-	-	+
C100/05	CLL-T (CD3+ CD4+ CD8+)	+	-	+
C103/05	CLL-T (CD3- CD8+)	-	-	+
C89/06	CLL-T (CD3-CD4+CD8+)	-	-	+
C92/05ln	linfoma centroblastico (CD21+ CD79+ CD34+)	B +	-	+
C92/05sg	non leucemico	+	-	+
C83/05 massa intestinale	linfoma linfoblastico (CD21+ CD79+ CD34+)	B +	-	+
C83/05sg	non leucemico	+	-	+
C64/05ln	linfoma pleomorfo a grandi cellule B (CD45- CD18Dim CD21Dim CD79+ CD34+)	+	-	-
C64/05sg	leucemico	+	-	-
C68/06b retrom	linfoma pleomorfo a grandi cellule T (CD3+ CD4+CD79+)	+	-	+
C68/06a presc	linfoma T-SCC (CD3+ CD4Dim)	-	-	+
C104/06	linfoma T-SCC (CD45Dim, CD21Dim)	-	-	+
C35/06ln	ALL-B (CD79+, CD34+)	+	-	+
C35/06sg	ALL-B (CD79+, CD34+)	+	-	-
C48/05	ALL-B (CD79+, CD34+)	+	-	-
C78/05linf	ALL-B (CD79+, CD34+)	+	-	-
C78/05MD	ALL-B (CD79+, CD34+)	-	-	+
C78/05sg	ALL-B (CD79+, CD34+)	-	-	-
C78/05sg	ALL-B (CD79+, CD34+)	-	-	-
C131/06	AML-4	-	-	-
C06/07	AML-7	+	-	-
C107/06	sarcoma istiocitario disseminato	-	-	-
C126/06	timoma	-	-	+

Tab.1: elenco dei casi, diagnosi, fenotipo e risultati PARR

EVALUATION OF ANTIGEN RECEPTOR GENE REARRANGEMENT IN CANINE HAEMATOPOIETIC NEOPLASMS

The current study analyses the rearrangement pattern of immunoglobulin H (IgH) and T-cell receptor (TCR) in canine haematopoietic neoplasms with aberrant phenotype and in non-lymphoid neoplasms. We analysed 19 cases: 3 AUL, 3 ALL-B, 3 CLL-T, 5 lymphomas, 2 AML, 1 disseminated histiocytic sarcoma with blood involvement and 1 thymoma. In acute undifferentiated leukaemia PARR resulted positive for TCR gene rearrangement and so was useful to identify the origin of neoplastic cells. In 5 cases, a dual rearrangement was found. In particular, in 1 ALL-B, 1 CLL-T, 2 B-cell lymphoma e 1 T-cell lymphoma. Also AML-7 and thymoma exhibited a monoclonal pattern for IgH gene and TCR gene, respectively. These results show as a so-called "aberrant" rearrangements in haematopoietic neoplasms is a common feature and so molecular analysis of antigen receptors should not be considered an independent diagnostic tool, rather these techniques complement clinical, morphological and immunologic analysis.

Key words: PARR, haematopoietic neoplasms, dog

ANALISI ISTOPATOLOGICA DEI MARGINI CHIRURGICI IN CASO DI FIBROSARCOMA VACCINO-ASSOCIATO NEL GATTO E DI MASTOCITOMA NEL CANE

Tursi Massimiliano¹, Rocco Valentina², Aresu Luca¹, Martano Marina¹, Morello Emanuela¹, Valenza Federico¹, Iussich Selina¹

¹ Dipartimento di Patologia Animale, Università di Torino, Grugliasco (TO), Italia

² Medico Veterinario, Torino

L'esame istologico dei margini chirurgici in caso di patologia neoplastica costituisce un utile strumento prognostico per la comparsa di eventuali recidive. Dalla valutazione istologica dei margini chirurgici, insieme ad altre fattori, può dipendere la prognosi del paziente e la decisione di attuare ulteriori interventi chirurgici o terapie adiuvanti. Scopo del presente studio è analizzare i margini chirurgici come fattore prognostico in 29 gatti con fibrosarcoma vaccino-indotto e 25 cani con mastocitoma cutaneo. Si è voluto in particolare correlare la condizione dei margini chirurgici, giudicata in base al grado di invasione da parte del tumore, e l'intervallo di tempo trascorso tra l'asportazione e l'eventuale recidiva o morte dei pazienti. I proprietari e il Veterinario curante, sono stati contattati ogni tre mesi a partire dall'intervento di escissione fino alla chiusura dello studio, sulla presenza di eventuali recidive. Per l'analisi statistica sono state utilizzate le curve di sopravvivenza di Kaplan-Meyer. Per quanto riguarda il fibrosarcoma vaccino-indotto nel gatto tali curve hanno evidenziato una correlazione statisticamente significativa tra l'estensione dei margini laterali e profondi e la prognosi dei pazienti, intesa come probabilità di recidiva e tasso di mortalità. Nei casi di mastocitoma cutaneo nel cane invece le curve di sopravvivenza non hanno rivelato una correlazione statisticamente significativa tra l'estensione dei margini, sia laterali sia profondi, e la prognosi. Invece è stato evidenziato un certo grado di correlazione tra il tasso di recidiva, la sopravvivenza dei soggetti e le dimensioni della neoplasia.

Parole chiave: margini chirurgici, fibrosarcoma, mastocitoma, cane, gatto

HISTOPATHOLOGICAL ANALYSIS OF SURGICAL MARGINS IN FELINE FIBROSARCOMA AND CANINE MAST CELL TUMOURS

Histopathological examination of surgical margins was evaluated to determine results of surgery for treatment of feline fibrosarcoma and canine mast cell tumour and to identify prognostic variables that can be used to predict outcome. From different studies in human pathology, exam of surgical margins from neoplasia excision becomes important for prognosis, or further surgical treatment in tumour recurrences or use of adjuvant therapy. The aim of this study was to characterize the surgical margins as prognostic factor for follow-up in 29 feline vaccine site-associated fibrosarcomas and 25 canine mast cell tumours. Resection margins status was correlated with tumour size, depth, histological type, and grade. The time gap between surgery and possible neoplasia recurrence or animal death was also considered. Owners and referring veterinarians were contacted for follow-up informations every three months to determine any possible tumour recurrence. Statistical analysis was performed using Kaplan-Meyer survival curves. In feline fibrosarcoma, a significant statistical association, in terms of tumour recurrence or cat death, was underlined by the match between the size of lateral / deep margins and prognosis. Otherwise, no significant association was found in canine cutaneous mast cell tumours between size of surgical margins and prognosis; while size of neoplasia seems to be more predictable for the index of recurrence of the mast cell tumours

Key words: surgical margins, fibrosarcoma, mast cell tumour, dog, cat

LESIONI NODULARI DI ORIGINE APOCRINA NEL GATTO PERSIANO: DESCRIZIONE DI 6 CASI

Sforna Monica; Brachelente Chiara; Lepri Elvio; Mechelli Luca

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

Gli Autori descrivono lesioni nodulari facciali di origine apocrina insorte in 6 gatti Persiani (1 F e 5 M), di età compresa tra 7 e 16 anni. I noduli erano di varie dimensioni, di consistenza da molle a ferma, alopecici e pigmentati. Venivano effettuate indagini citologiche, istologiche ed immunoistochimiche. La citologia eseguita da uno dei gatti con noduli palpebrali evidenziava materiale amorfo brunastro accanto a cellule epiteliali contenenti granuli di pigmento ed elementi macrofagici. Gli esami istopatologici evidenziavano cisti multiple di varie dimensioni, che contenevano materiale fluido di aspetto omogeneo (ciste apocrina). Talvolta l'epitelio era rappresentato da più strati cellulari e da proiezioni papillifere all'interno delle strutture cistiche (cistadenoma apocrino). Alcune lesioni erano delimitate da numerosi strati di cellule con atipia marcata, perdita della polarità e attività mitotica elevata (adenocarcinoma apocrino). Le indagini immunoistochimiche (CK, SMA e Ki-67) confermavano la natura ghiandolare delle lesioni ed il carattere proliferativo delle forme neoplastiche. In medicina umana è descritta una lesione analoga, definita idrocistoma apocrino, caratterizzata dalla formazione di cisti multiple facciali. Alterazioni sovrapponibili sono descritte, seppur raramente, anche nel cane e nel gatto, dove si possono osservare cisti multiple a livello auricolare (cistomatosi ceruminosa) e lesioni nodulari facciali di natura neoplastica delle ghiandole apocrine (cistadenoma/carcinoma apocrino). Il riscontro di queste lesioni risulta importante nell'ambito delle diagnosi differenziali di noduli facciali pigmentati del gatto.

Parole chiave: gatto Persiano, ciste apocrina, cistadenoma apocrino, adenocarcinoma apocrino

APOCRINE GLAND LESIONS IN THE PERSIAN CAT: 6 CASES

The authors describe apocrine gland lesions in 6 Persian cats (1F and 5 M), ranging from 7 to 16 years, with a pinnal and facial distribution. The lesions were characterized by dark brown to black nodules, firm or slightly soft with alopecic surface. Cytological, histological and immunohistochemical investigations were performed. The cytology of a palpebral nodule showed a background of brownish material admixed with epithelial cells with vacuolated cytoplasm often containing pigmented, granular material and with rare macrophages. Histopathology showed multiple cysts, lined by well differentiated epithelial cells. The cysts contained homogeneous fluid material intermixed with brownish, granular material (apocrine cyst). Sometimes the epithelium was arranged in multiple layers, forming papillary projections towards the lumen (apocrine cystadenoma). Some epithelial cells were characterized by marked atypia, loss of the polarity and increased mitotic activity (apocrine adenocarcinoma). Immunohistochemistry (CK, SMA and Ki-67) confirmed the glandular origin and the proliferative nature of the lesions. In human medicine, a similar lesion characterized by multiple facial cysts, is described (apocrine hydrocystoma). Similar findings were rarely described in the dog and cat, where multiple cysts on the pinna (ceruminous cystomatosis) and apocrine gland tumors of the face (cystadenoma/apocrine carcinoma) are described. Summarizing, it is important to include cystic lesion of apocrine glands in the differential diagnoses of pigmented facial nodules of the cat.

Key words: Persian cat, apocrine cyst, apocrine cystadenoma, apocrine adenocarcinoma

UN CASO DI LINFOMA A GRANDI LINFOCITI GRANULOSI (LGL) IN UN CAVALLO: CARATTERIZZAZIONE ISTOCHEMICA ED IMMUNOFENOTIPICA

Antuofermo Elisabetta, Nuvoli Sara, Cossu Rocca Paolo¹, Mura Tonina¹, Rocca Stefano, Burrai Giovanni, Farigu Serafina, Columbano Nicola, Pirino Salvatore, Leoni Antonio

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

Il linfoma è una neoplasia raramente osservata nel cavallo se comparata al bovino, al cane e al gatto. Tuttavia viene considerata la neoplasia più comune del sistema ematopoietico equino. Le forme anatomiche più frequenti sono la forma digerente, la multicentrica e la cutanea. Il linfoma a grandi linfociti granulosi (LGL) è veramente raro nel cavallo, solamente 4 casi sono riportati in bibliografia. Una fattrice di razza anglo-arabo-sarda, di 5 anni, venne sottoposta a visita per la presenza di una grave sintomatologia respiratoria ed un rapido dimagrimento. Un primo sospetto diagnostico di linfoma venne formulato sulla base di una estemporanea di biopsia muscolare e di un campione di mucosa nasale eseguito per via endoscopica. La gravità del caso clinico sconsigliava qualsiasi tipo di terapia e imponeva l'eutanasia. Sfortunatamente solamente la testa venne inviata al nostro dipartimento impedendo così l'osservazione di eventuali organi coinvolti e la conoscenza dell'origine primaria della neoplasia. Lo scopo del presente lavoro è stato quello di confermare il sospetto diagnostico di linfoma, di caratterizzare l'immunofenotipo della neoplasia ed indagare mediante colorazioni istochimiche la tipologia delle cellule neoplastiche coinvolte. L'esame macroscopico della testa ha mostrato la presenza di masse biancastre, di aspetto cerebroide e consistenza lardacea nella cavità nasale sinistra, nei seni mascellare e frontale, nella cavità orbitale dello stesso lato, nei linfonodi sottomandibolari e retrofaringei, nonché l'infiltrazione massiva del legamento nucale e degli adiacenti muscoli del collo. Il quadro istologico era comune a tutte le lesioni sopradescritte: si osservava la presenza di una infiltrazione neoplastica di cellule rotonde per lo più di grandi dimensioni, con ampio citoplasma con presenza di granuli PTAH positivi. Tali cellule erano CD3 positive, CD20 e CD79A negative. Sulla base dei risultati ottenuti è stata avanzata una diagnosi di linfoma T a grandi linfociti granulosi (LGL) di probabile forma multicentrica.

Parole chiave: linfoma a linfociti granulosi, cavallo, immunoistochimica

LARGE GRANULAR LYMPHOMA (LGL) IN A HORSE: HISTOCHEMICAL AND IMMUNOPHENOTYPE CHARACTERIZATION

Lymphoma is the most common neoplasia of the equine haematopoietic system. Lymphomas have most commonly intestinal, multicentric, and cutaneous forms. A five-year-old Anglo-Arab-Sardinian mare, was examined for weight loss and severe dyspnoea. Diagnosis of suspected lymphoma was made by an extemporary muscle biopsy. On the basis of biopsy specimens histological diagnosis of upper respiratory tract large granular lymphoma (LGL) was made. Subsequent course of the disease was surprisingly rapid and euthanasia was performed. Complete necropsy, which is the most reliable method of confirming abdominal mass presence, was not possible in this case and only the horse head was examinable. The aim of this study is to confirm lymphoma diagnosis, characterize the neoplasia immunophenotype and observe cell typologies by histochemical staining. At gross morphology, lardaceous and cerebroid masses, involving left nasal cavity, frontalis and maxillaris sinuses, submandibolar lymphnodes and neck muscle, were seen. Histology showed an infiltrate of predominantly big, round and PTAH-positive cells. These cells were also CD3-positive. Based on our results we formulated a T-type LGL diagnosis, presumably of multicentric form.

Key words: large granular lymphoma, horse, immunohistochemistry

NODULO FIBROISTIOCITARIO SPLENICO IN UN CANE DIAGNOSTICATO INIZIALMENTE COME LINFOMA

Gregori M*, Pagani R°, Bernabei Daniela§, Castelli Ilaria§

*Dipartimento di Patologia Animale, Università di Pisa

°Libero professionista, Modena

§ Centro Oncologico Modenese: Emolinfopatologia, Modena

Si riporta il caso di una proliferazione splenica fibroistiocitaria in un cane meticcio, femmina in età geriatrica a cui inizialmente veniva diagnosticato un linfoma splenico a linfociti T. In seguito a splenectomia il cane riprendeva in pieno le proprie funzioni e i proprietari rifiutavano il protocollo chemioterapico raccomandato per il carattere aggressivo della neoplasia, richiedendo invece una rivalutazione del caso. La revisione istopatologica descrive la neoformazione splenica come costituita da aree di proliferazione di cellule istiocitoidi e di elementi mesenchimali fusati. Porzioni della massa risultano invece costituite da infiltrato massivo di piccoli linfociti, plasmacellule e macrofagi. La caratterizzazione immunohistochimica effettuata con una gamma di marker selezionati (desmina, actina, vimentina, CD3, CD79, Mac387) dimostra una positività variabile delle cellule mesenchimali fuse per actina e desmina. La popolazione di piccoli linfociti a distribuzione uniforme mostra immunoreattività per il marker CD3 dei linfociti T ma aggregati follicolari sparsi risultano positivi al marker CD79 della linea B indicando una assenza di evidente malignità nella proliferazione linfocitaria. Viene emessa una diagnosi definitiva di nodulo fibroistiocitario di incerto grado di malignità e si decide di non optare per chemioterapia adiuvante considerando che la prognosi per questo tipo di neoplasia è più ottimistica rispetto al linfoma T splenico. Il cane viene a morte dopo 10 mesi dalla diagnosi iniziale, l'autopsia non viene concessa, ma la presenza di anomalie del profilo biochimico epatico suggeriscono un danno epatocellulare da probabile metastasi.

Parole chiave: nodulo fibroistiocitario, cane, splenomegalia, immunohistochimica

SPLENIC FIBROHISTIOCYTIC NODULE IN A DOG RESEMBLING LYMPHOMA

This paper reports a case of nodular fibrohistiocytic proliferation in the spleen of a geriatric mixed breed female dog presented with an initial histopathological diagnosis of splenic T-cell lymphoma. After splenectomy the dog quickly ameliorated. Chemotherapy, recommended due to the aggressive behaviour of splenic T-cell lymphoma, was refused by the owner and reviewing of the first diagnosis was requested. At histopathological reevaluation the microscopic changes in the spleen were described as consisting of a mixed population of histiocytoid and spindle cells in varying proportion arranged in a storiform pattern admixed with lymphoid cells, plasma cells and macrophages. At this point the results of immunohistochemical studies for selected markers (desmin, smooth muscle actin, vimentin, CD3, CD79, Mac387) showed variable staining characteristics for desmin and actin in the spindle cell population. Lymphocytic cells widely distributed throughout the tumour showed immunoreactivity for the T cell marker CD3 while those arranged in follicular aggregates were positive for the B cell marker CD79, thus indicating absence of evident malignancy for the lymphoid proliferation. The conclusive diagnosis was spleen fibrohistiocytic nodule of uncertain grade of malignancy and no adjuvant therapy was instaurated. A better prognosis was proposed compared to the short survival time for T-cell lymphoma. The dog died after 10 months from initial clinical signs with serum biochemical abnormalities indicating hepatocellular damage probably due to liver metastasis, necropsy was not allowed.

Key words: fibrohistiocytic nodule, dog, splenomegaly, immunohistochemistry

PRODUZIONE DI PROTEINE DI FASE ACUTA IN COLTURE PRIMARIE DI EPATOCITI FELINI

Giordano Alessia, Paltrinieri Saverio

Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Sezione di Patologia Generale e Parassitologia – Via Celoria 10, 20133 Milano

In corso di coronavirusi felini (FCoV) e di peritonite infettiva felina (FIP), il fegato modula la produzione di proteine di fase acuta, principalmente AGP (α 1 glicoproteina acida) e SAA (siero amiloide A). L'utilizzo di metodi in vitro per valutare questa risposta permetterebbe di chiarire alcuni aspetti patogenetici delle coronavirusi feline. Nell'uomo e negli animali da laboratorio sono state messe a punto tecniche per l'allestimento di colture epatocitarie che prevedono l'espianto in vivo di fegato o di sue parti, non praticabili in patologia spontanea felina, dove i tessuti vengono prelevati post-mortem. In questo studio abbiamo voluto verificare l'applicabilità di alcuni protocolli di coltivazione di epatociti o di tessuto epatico nella specie felina. In una prima fase si sono valutati gli aspetti morfologici e quantitativi, notando che la digestione con collagenasi porta ad una bassa resa cellulare e determina alterazioni morfologiche, che sono risultate minime mediante il semplice lavaggio di frammenti di tessuto epatico. Quest'ultimo metodo consente di preservare le interazioni tra epatociti e stroma, indispensabili per una corretta funzionalità epatocitaria. E' stata poi valutata la risposta proteica sia di epatociti isolati sia di frammenti di tessuto epatico. I risultati indicano che la bassa resa cellulare non rende possibile la valutazione della produzione di proteine su epatociti isolati con collagenasi, mentre l'incubazione di frammenti di tessuto permette di ottenere una produzione di proteine apprezzabile, nonché un aumento di questa produzione nelle prime 24 ore di incubazione, seguito da un declino nei due giorni successivi. La determinazione di AGP e SAA con metodi immunologici è risultata negativa, forse a causa della bassa sensibilità analitica, mentre mediante SDS-PAGE e Western blotting, entrambe le proteine risultano presenti e l'incubazione degli epatociti con liquido ascitico di animali con FIP mostra, rispetto ai controlli "non trattati" variazioni quali-quantitative, suggerendo che tale metodo è utilizzabile nello studio delle interazioni virus-ospite.

Parole Chiave: epatociti di gatto, proteine di fase acuta, peritonite infettiva felina (FIP).

INTRODUZIONE

La reazione di fase acuta rappresenta un'articolata risposta ad uno stimolo flogistico, spesso di origine infettiva, ed è modulata da fattori solubili presenti nel plasma. Tra gli effetti sistemici di questa reazione si assiste alla produzione di proteine di fase acuta positive da parte degli epatociti. La peritonite infettiva felina (FIP) è una patologia sostenuta da coronavirus felini (FCoVs), caratterizzata da notevoli variazioni delle due principali proteine di fase acuta del gatto, la alfa-1-glicoproteina acida (AGP) e la siero amiloide A (SAA)^{1,2}. L'AGP viene addirittura considerata un utile marker nella diagnosi della patologia³ e in corso di FIP appare iposialilata mentre nei gatti resistenti alla patologia si osserva un aumento della sialilazione⁴. Scopo di questo lavoro è mettere a punto protocolli utili ad ottenere epatociti felini (non derivati da linee cellulari standard) funzionali e vitali, sui quali poter quantificare il pool proteico prodotto, eseguire studi quali-quantitativi su proteine di fase acuta quali AGP e SAA. I protocolli utilizzati in animali di laboratorio ed uomo, prevedono l'incannulamento dei vasi epatici e l'isolamento di un intero lobo epatico, o la sua resezione chirurgica, e successivamente la perfusione con soluzioni contenenti collagenasi, che permette il distacco e la raccolta di epatociti. Nello studio di patologie spontanee della specie felina è impensabile poter disporre di animali da poter campionare in vita o da sacrificare in seguito al prelievo. E' quindi necessario mettere a punto un protocollo su campioni ottenuti post mortem.

MATERIALI E METODI

Sono stati inclusi nello studio gatti deceduti per cause diverse, mantenendo come unico criterio di inclusione un intervallo morte-prelievo inferiore alle 12 ore. Da un gatto affetto da FIP essudativa, è stato prelevato il liquido ascitico che è stato ultracentrifugato per ottenere un sedimento ricco di virus (identificato mediante microscopia elettronica) ed un surnatante contenente presumibilmente fattori solubili e citochine. I liquidi biologici così allestiti, sono stati aliquotati ed utilizzati nelle prove successive come attivatori per gli epatociti messi in coltura.

In tutte le prove eseguite la porzione di fegato veniva rimossa utilizzando strumenti chirurgici sterili e posta immediatamente in tampone Hepes sterile di mantenimento. La porzione di fegato veniva poi ulteriormente suddivisa in frammenti di peso comparabile. Nelle prime 5 prove sono state saggiate diverse concentrazioni di collagenasi aggiunta ai medium di coltura, nonché diversi tempi di incubazione con i frammenti di fegato, allo scopo di identificare il protocollo più adatto ad ottenere un'alta

resa cellulare. Le ultime 3 prove sono state invece allestite mettendo in coltura frammenti di fegato non sottoposti precedentemente a trattamento enzimatico con collagenasi. Dopo diversi lavaggi per eliminare l'eventuale sangue presente, gli epatociti ottenuti venivano posti in piastre sterili e il medium di coltura veniva rimosso e cambiato ad intervalli regolari, esaminandone il contenuto cellulare mediante analisi microscopica di citocentrifugati. Le cellule venivano inoltre sottoposte a prove di vitalità (esclusione di trypan blue). I surnatanti di coltura venivano inoltre sottoposti alla misurazione spettrofotometrica della concentrazione delle proteine totali con apparecchio nanodrop e successivamente venivano utilizzati per l'esecuzione di elettroforesi in gel di poliacrilamide (SDS-PAGE, Biorad). I gel di poliacrilamide sono stati successivamente sottoposti a Western Blotting e le membrane di nitrocellulosa sono state sottoposte ad immunocolorazione utilizzando anticorpi anti AGP felina ed anti SAA. La presenza di proteina è stata poi messa in evidenza mediante chemiluminescenza o diaminobenzidina.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Nelle prove in cui i frammenti di fegato sono stati incubati con soluzione contenente collagenasi, sono stati ottenuti dei surnatanti di coltura caratterizzati da epatociti ben conservati, senza alterazioni morfologiche di rilievo e con vitalità superiore al 90%. Tuttavia questi campioni mostravano una cellularità molto bassa, non sufficiente a rilevare una sostanziale presenza di proteine che, dopo SDS-PAGE, sono risultate composte prevalentemente dall'albumina contenuta nel medium di coltura. Nella prima prova in cui è stato posto in coltura un intero frammento di fegato la concentrazione proteica dei surnatanti era sensibilmente maggiore rispetto alle prove precedenti (valore medio 11,96 mg/ml rispetto a 1,83 mg/ml). L'SDS-PAGE non ha permesso di rilevare bande proteiche ben definite riconducibili ad AGP o SAA, a causa probabilmente del ridotto tempo di incubazione e della contaminazione batterica rilevata microscopicamente. Nelle ultime due prove (gatti n° 8 e 9), in cui è stato possibile disporre di campioni epatici in tempi molto brevi (entro 30 minuti) dalla morte dei soggetti, sono stati ottenuti buoni risultati in termini di produzione proteica da parte degli epatociti (> 20 mg/ml in entrambe le prove). Aggiungendo inoltre antibiotici (di norma sconsigliati nelle colture epatiche in quanto possono interferire con le vie metaboliche) al medium di coltura è stato possibile ovviare al problema della contaminazione batterica. In entrambi i casi è stato possibile evidenziare un picco della concentrazione proteica dei surnatanti di coltura dopo 24 ore di incubazione (Figura 1), che

successivamente ritornava ai più bassi valori iniziali. Il gatto 8 però, cui era stata diagnosticata una forma atipica di FIP essudativa, senza presenza di virus e anticorpi circolanti, mostrava il picco di concentrazione proteica in corrispondenza del pozzetto attivato con sedimento di liquido ascitico; al contrario, il gatto 9, deceduto per una anomalia congenita, presentava il picco proteico in corrispondenza del pozzetto stimolato con tumor necrosis factor, ma anche gli epatociti stimolati con il surnatante del liquido ascitico presentavano valori di proteina superiori a quelli rilevati nel gatto n° 8 (Figura 1). Per rispondere al dubbio che le proteine non fossero prodotte da epatociti funzionali, ma rilasciate in seguito alla lisi degli epatociti stessi, abbiamo misurato nei surnatanti di coltura l'attività dell'enzima alanin-transferasi (ALT), marker di citolisi degli epatociti. Come evidenziato dalla Figura 2, l'attività dell'ALT è risultata minima, se non assente, nei surnatanti prelevati dopo 24 ore di incubazione, proprio quando era stato registrato il picco di concentrazione proteica. L'attività dell'ALT comincia ad aumentare quando la concentrazione di proteine nei pozzetti risulta minima dopo le 24 ore. Risultati opposti sono invece stati registrati nei surnatanti di coltura degli epatociti stimolati con TNF. Questi risultati indicano che ad eccezione degli epatociti stimolati con TNF la presenza di proteine in tutti i pozzetti è da imputare ad un'attiva produzione da parte degli epatociti, che probabilmente dopo 24 ore vanno incontro ad esaurimento funzionale o a lisi. L'elettroforesi SDS-PAGE e l'immunocolorazione mostrano in tutti i surnatanti di coltura degli epatociti del gatto 8, senza differenze evidenti legate al tipo di stimolazione in vitro, la presenza di diverse proteine (evidenti soprattutto dopo 24 ore di incubazione) e bande positive all'anticorpo anti AGP felina (peso molecolare variabile tra 22 e 45 KDa, verosimilmente identificabili come isoforme di AGP a differente sialilazione⁴). Nel gatto 9 si è rilevata un picco di produzione proteica dopo 24 ore di incubazione, con una concentrazione più elevata nel pozzetto contenente epatociti attivati col surnatante ascitico, nel quale erano particolarmente evidenti bande proteiche positive all'anticorpo anti AGP felina. In questo gatto è stato inoltre possibile evidenziare dopo 24 ore di incubazione una banda di peso di 90 KDa circa positiva all'anticorpo anti SAA verosimilmente riconducibili a polimeri di tale proteina (Figura 3).

In conclusione, nel presente lavoro è stato possibile riscontrare come le tecniche di coltura di epatociti citate in letteratura siano difficilmente applicabili con campioni ottenuti post mortem, ma apportando delle modifiche e utilizzando campioni da soggetti deceduti non oltre 30 minuti è possibile ottenere epatociti vitali e funzionali anche nella specie felina. E' stato infatti possibile osservare una produzione attiva di proteine da

parte degli epatociti in coltura, con un picco di produzione dopo 24 ore di incubazione e successivamente una sorta di esaurimento funzionale. Tale produzione proteica sembra variare in funzione del tipo di stimolo applicato in vitro. E' stato possibile inoltre riscontrare una differente risposta nel gatto affetto da FIP. La disponibilità di tale metodo potrà permettere, in futuro, di approfondire il tipo di risposta epatocitaria alla presenza di coronavirus.

BIBLIOGRAFIA

1. *Stoddart ME et al.* Cats inoculated with feline infectious peritonitis virus exhibit a biphasic acute phase plasma protein response. *Vet Rec* 1988;123:621-624.
2. *Giordano A et al.* Changes in some acute phase protein and immunoglobulin concentrations in cats affected by feline infectious peritonitis or exposed to feline coronavirus infection. *Vet J* 2004;167(1):38-44.
3. *Duthie S et al.* Value of α 1-acid glycoprotein in the diagnosis of feline infectious peritonitis. *Vet Rec* 1997;141:299-303.
4. *Ceciliani F et al.* Decreased sialylation of the acute phase protein alpha1-acid glycoprotein in feline infectious peritonitis (FIP). [Vet Immunol Immunopathol](#). 2004 Jun;99(3-4):229-36.

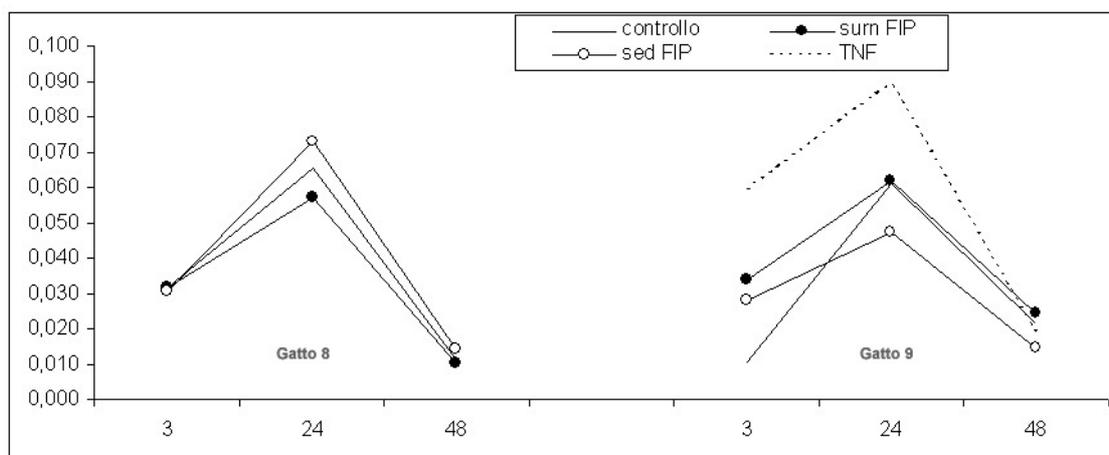


Figura 1. Variazione della concentrazione proteica in funzione del tempo di incubazione degli epatociti e del tipo di stimolazione.

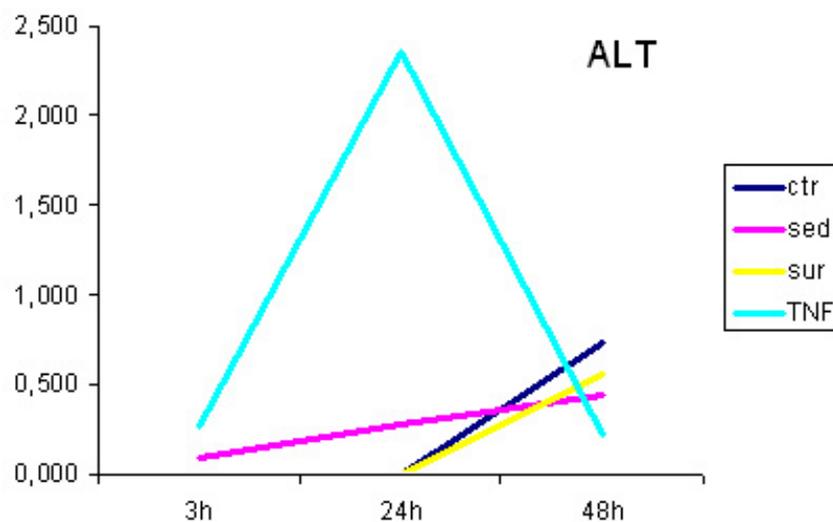


Figura 2. Gatto 9 – Variazione dell’attività dell’ALT in funzione del tempo di incubazione degli epatociti e del tipo di stimolazione.

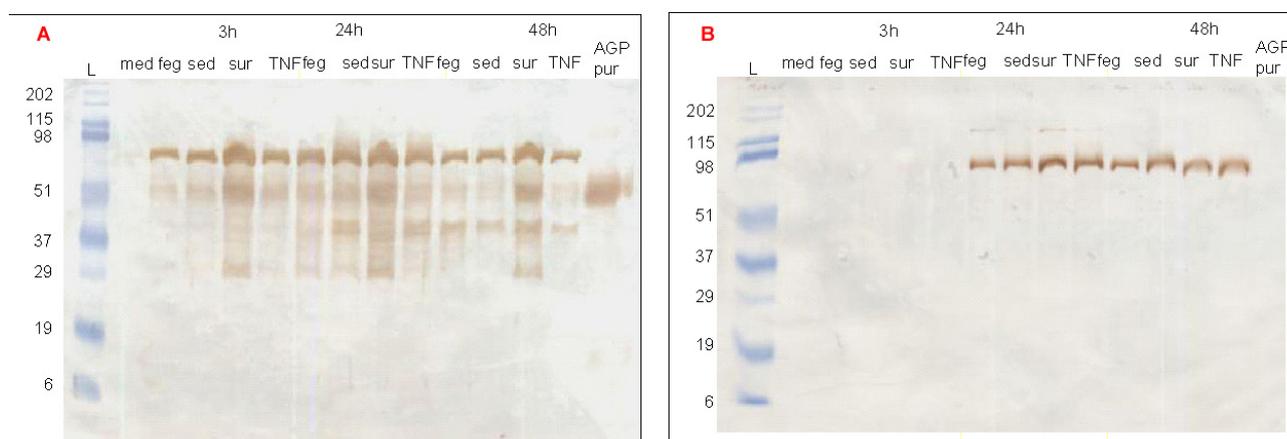


Figura 3. Gatto 9 - risposta all’anticorpo anti fAGP e all’anticorpo anti SAA delle proteine del surnatante di coltura degli epatociti in funzione del tempo di incubazione e del tipo di stimolazione.

ACUTE PHASE PROTEINS PRODUCTION IN PRIMARY CULTURED FELINE HEPATOCYTES

During feline coronaviruses (FCoV and FIP), the liver produces acute phase proteins (APP) such as AGP and SAA. The availability of in vitro techniques to study APP production by feline liver would help to understand the pathogenesis of feline coronaviruses. In this study we evaluated different protocols to culture feline hepatocytes or tissue fragments. The first step was to verify morphology and recovery rate of the hepatocytes: we concluded that collagenase digestion induces severe morphological alteration and/or a low recovery, while cells from washed tissue fragments maintain a good morphology. We then evaluated protein production in both isolated hepatocytes and tissue fragments: the cells obtained after collagenase were few to measure proteins, while proteins produced by tissue fragments can be measured: this concentration increases until 24 hours of incubation, decreasing in the following two days. AGP and SAA are not measurable by RID or ELISA, but can be evaluated by SDS-PAGE followed by Western blotting. APP production increases after incubation with ascites from FIP cats. Incubation of liver fragments could thus be a suitable method to study FCoV-host interaction.

Keywords: cat hepatocytes, acute phase proteins, feline infectious peritonitis (FIP)

**STUDIO DELL'EFFETTO DELL'ALPHA-1- GLICOPROTEINA ACIDA BOVINA SULLA
CHEMOTASSI DI NEUTROFILI E DI MONOCITI BOVINI E SULL'ESPRESSIONE DEGLI
ANTIGENI DI MEMBRANA CD11B, CD18 E CD47**

Lecchi Cristina, Cecilian Fabrizio, Bernasconi Sergio*, Perfetto Stefano, Franciosi Federica, Bronzo Valerio, Sartorelli Paola

*Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Università di Milano, Via Celoria 10, 20133 Milano. *Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, via Eritrea, 62, 20157 Milano.*

L'alpha-1-glicoproteina acida (AGP) è una proteina di fase acuta identificata nell'uomo e in molte specie animali; la sua concentrazione aumenta in seguito a danni tissutali, infiammazione sistemica e infezioni.

L'AGP è in grado sia di legare e trasportare numerose molecole idrofobiche sia di svolgere un'attività immunomodulatoria sulle cellule del sangue. Nel nostro laboratorio si è dimostrato che la AGP bovina (boAGP) riduce in vitro l'apoptosi dei monociti bovini e la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) da parte di granulociti attivati. Lo scopo di questo studio è stato studiare se la boAGP svolge un'azione modulatrice sulla chemotassi di monociti e granulociti bovini.

Abbiamo valutato la chemotassi di monociti e neutrofilii bovini stimolati con due concentrazioni di boAGP (una simile a quella riscontrata in stati fisiologici, l'altra in stati di reazione sistemica) in una camera di Boyden, utilizzando come chemotattici ZAS e IL8. Al fine di identificare un possibile meccanismo d'azione, abbiamo valutato l'espressione di alcuni antigeni di membrana (CD11b, CD18 e CD47) coinvolti nei processi di chemotassi mediante Real time PCR e citometria a flusso. I risultati hanno dimostrato che la chemotassi dei neutrofilii non subisce modificazioni significative, mentre quella dei monociti stimolati con concentrazioni di boAGP, che si riscontra in corso di fase acuta, è ridotta in modo statisticamente significativo ($P < 0.001$). Sempre a carico dei monociti abbiamo riscontrato la riduzione dell'espressione dell'antigene CD18 a livello sia di mRNA sia di proteina di membrana, mentre nessuna variazione si è osservata a carico degli antigeni CD11b e del CD47.

I nostri risultati confermano l'attività immunomodulatoria della boAGP e dimostrano che essa influenza la migrazione dei monociti bovini, modulando l'espressione dell'integrina beta-2, regolando la subunità CD18.

Parole chiave: AGP, Chemotassi, proteina di fase acuta, bovino, integrina beta-2.

INTRODUZIONE

Durante una reazione infiammatoria i leucociti si accumulano a livello del tessuto colpito, determinando sintomi infiammatori caratteristici. Per arrivare al sito infiammatorio, i leucociti devono aderire alle cellule endoteliali e filtrare attraverso le loro giunzioni. Alla base di questi meccanismi sono coinvolte numero molecole di adesione e fattori chemotattici (Sprinter, 1990; Harris et al., 2000). L'adesione è reversibile ed è determinata da specifici stimoli chemotattici che attivano la famiglia delle integrine α_2 , di cui fa parte MAC1, una proteina di membrana costituita da due subunità, CD11b e CD18 (Gahmberg et al., 1998), presente sia sui neutrofilii sia sui monociti. L'importanza della catena $\alpha_2\beta_1$ CD18 nella difesa immunitaria appare chiara se si osserva la maggior suscettibilità alle infezioni da parte degli individui che presentano una mutazione a carico del CD18, un disordine genetico noto come Leukocyte Adhesion Deficiency (LAD) (Nagahata H, 2004). Molto recentemente si è scoperto che un'altra proteina di membrana, la Integrin Associated Protein (IAP) o CD47, svolge un ruolo importante nella diapedesi dei neutrofilii sia umani sia bovini (Liu Y, 2001; Lamote I, 2006), mentre ben poco si sa sulla sua funzione nei monociti.

L' α -1-glicoproteina acida (AGP) è una proteina di fase acuta identificata nell'uomo e in molte specie animali, la cui concentrazione ematica aumenta in seguito a danni tissutali, infiammazione sistemica e infezioni. L'AGP è in grado sia di legare e trasportare numerose molecole idrofobiche sia di svolgere un'attività immunomodulatoria sulle cellule del sangue. Nell'uomo si è osservato che la AGP è in grado di agire in modo dose-dipendente sui neutrofilii, diminuendo ad esempio la risposta chemotattica all' α -MPLP, inibendo l'aggregazione e la produzione di ROS (Costello et al., 1984; Hochepped, 2003). Risultati contraddittori si sono osservati per quanto concerne la azione di questa proteina sui monociti umani: alcuni hanno riportato che la boAGP determina un aumento della produzione di IL1 (Sing e Fudenberg, 1984), altri invece hanno ottenuto risultati opposti (Nakamura et al., 1993); il nostro gruppo ha dimostrato che la AGP bovina è in grado di agire sui monociti bovini diminuendo la apoptosi sia indotta sia spontanea (Ceciliani et al., 2007).

Il nostro studio mira a indagare l'eventuale azione della boAGP sulla chemotassi di monociti e di neutrofilii bovini purificati da sangue intero e prevede di valutare:

1. la chemotassi di monociti e neutrofilii mediante l'utilizzo della cameretta modificata di Boyden;

2. gli antigeni di membrana coinvolti nella chemotassi (CD11b, CD18 e CD47) mediante citometria a flusso;
3. la modulazione della produzione di mRNA corrispondente ai tre antigeni mediante Real time PCR.

MATERIALE E METODI

I monociti di 8 animali sani sono stati purificati a partire da sangue intero bovino: mediante stratificazione su Ficoll si sono ottenute le cellule mononucleate, a partire dalle quali i monociti sono stati purificati mediante selezione positiva utilizzando l'anticorpo anti-CD14 associato alla tecnologia delle MACS (Miltenyi-Biotech).

I neutrofilii di 6 animali sani sono stati purificati mediante stratificazione su gradiente di Percoll 1.087g/ml.

Per valutare la azione della boAGP sulla chemotassi di monociti e neutrofilii, le cellule (1.5×10^6 cell/ml) sono state stimulate con: boAGP a concentrazione fisiologica, 0.3 mg/ml, boAGP a concentrazione patologica, 0.9 mg/ml (Eckersall et al., 2001; Horadagoda et al.1999), ZAS (Zymosan Activated Serum) 1:5 vol/vol, recombinant human Interleukin 8 (solo neutrofilii) 100 ng/ml. Successivamente è stata allestita la cameretta modificata di Boyden aggiungendo nei pozzetti inferiori come controllo negativo il terreno e come chemotattici lo ZAS da solo o con la boAGP alle due concentrazioni, mentre nei pozzetti superiori le cellule stimulate. Dopo incubazione a 37°C, 5% CO₂, 75 min per i neutrofilii e 105 min pr i monociti, la migrazione è stata valutata contando al microscopio le cellule che avevano attraversato il filtro.

Abbiamo quindi studiato l'espressione degli antigeni di membrana CD11b, CD18 e CD47 delle cellule stimulate (4 animali per i monociti, 1 animale per i neutrofilii); la modificazione della quantità di antigeni è stata valutata confrontando l'espressione relativa delle cellule trattate con la boAGP rispetto a quelle trattate solo con ZAS. I campioni sono stati acquisiti con citometro a flusso FACS Calibur cytometry system (Becton Dickinson) (1×10^4 eventi/campione). Per ciascun anticorpo è stato utilizzato il corrispondente controllo isotipico.

Per valutare la variazione della quantità di mRNA di ciascun antigene l'RNA totale dei monociti stimolati è stato estratto e retrotrascritto. Il cDNA ottenuto è stato usato come *template* per allestire la Real time PCR insieme a primers specifici disegnati sulla sequenza di ciascun antigene. Abbiamo valutato l'espressione relativa dell'mRNA dei tre antigeni presi in considerazione rispetto al gene housekeeping GAPDH.

RISULTATI

La boAGP è in grado di modulare la chemotassi dei monociti, ma non quella dei neutrofilii. Come si vede in figura 1A la boAGP a concentrazioni patologiche (0.9 mg/ml) è in grado di ridurre in modo statisticamente significativo ($P < 0.001$) la chemotassi dei monociti verso lo ZAS, mentre a concentrazioni fisiologiche non si rileva nessuna modificazione (fig.1). La proteina non ha invece nessun effetto sulla chemotassi dei neutrofilii stimolati sia con ZAS (fig. 1B) sia con rh-IL8 (fig. 1C). L'analisi degli antigeni di membrana ha evidenziato che i monociti stimolati con lo ZAS in associazione alla boAGP alla concentrazione patologica si suddividono in due popolazioni, una delle quali presenta una riduzione del 18% dell'espressione dell'antigene CD18 (fig.2A) rispetto al controllo stimolato solo con lo ZAS. Nessuna variazione si osserva a carico degli antigeni CD11b e CD47.

I dati relativi alla citometria dei neutrofilii sono ancora preliminari, poiché l'analisi è stata condotta solo su un animale. I risultati preliminari mostrano la comparsa di una popolazione con aumentata espressione dell'antigene CD47, dopo stimolazione con rhIL8 e boAGP 0.9 mg/ml (fig. 2B). I risultati relativi alla stimolazione dei neutrofilii con ZAS mostrano un aumento dell'antigene CD18, quando il chemotattivo viene aggiunto in presenza della proteina a concentrazioni patologiche, mentre nessuna variazione si osserva a carico del CD11b e del CD47 (fig. 2C).

Nella figura 2 è stata omessa la curva relativa alla popolazione di cellule stimolate con boAGP alla concentrazione fisiologica (0.3 mg/ml), poiché essa risulta sovrapponibile alla curva relativa alle cellule stimolate solo con il chemotattivo (ZAS/rhIL8).

L'analisi dell'mRNA mediante Real time PCR è stata al momento condotta solo sui monociti; la stimolazione con lo ZAS, da solo o in associazione alle due concentrazioni di boAGP, non determina alcuna variazione statisticamente significativa dell'espressione dell'mRNA (fig.3).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'azione della boAGP sulla chemotassi dei monociti e dei neutrofilii è differente ed è dose-dipendente. Si osserva infatti che la boAGP ad elevate concentrazioni, pari a quelle riscontrate in corso di stati infiammatori, è in grado di agire sui monociti, determinando una diminuzione della chemotassi verso i fattori chemotattivi. Questa azione risulta essere selettiva, poiché gli esperimenti non mostrano alcuna modificazione della chemotassi dei neutrofilii. Questo dato differisce con quanto riportata nell'uomo da Laine

et al.(1990), il quale dimostra che la AGP determina una riduzione della chemotassi dei neutrofilii.

La riduzione della chemotassi è verosimilmente dovuta ad una diminuzione del CD18 a livello di membrana, come dimostrano i dati della citometria a flusso. Una riduzione della subunità CD18 non permette la formazione del dimero CD11b/CD18; MAC1 risulta quindi presente in numero ridotto sulla membrana delle cellule determinando una minor adesione e diapedesi. Il coinvolgimento di Mac1 in questo processo è documentato in letteratura (Smits et al., 2000; Mazzone e Ricevuti, 1995), mentre il coinvolgimento del CD47 è poco conosciuto, soprattutto per quanto riguarda i monociti. La riduzione del CD18 ha un effetto non solo sulla formazione di MAC1, ma anche su quella degli altri componenti della famiglia delle integrine $\alpha 2$, in cui il CD18 è la subunità costante. Il risultato quindi mostra che la boAGP è in grado di ridurre la chemotassi dei monociti agendo sulla espressione di membrana della famiglia delle integrine $\alpha 2$, principali responsabili di tale processo; i dati relativi all'espressione dell'mRNA indicano invece che la boAGP non ha effetto sulla sintesi di nuove molecole di CD11b, CD18 e CD47.

Benché non si osservino variazioni a carico del CD47, gli esperimenti condotti ci permettono di affermare che anche i monociti bovini presentano sulla loro superficie questo antigene.

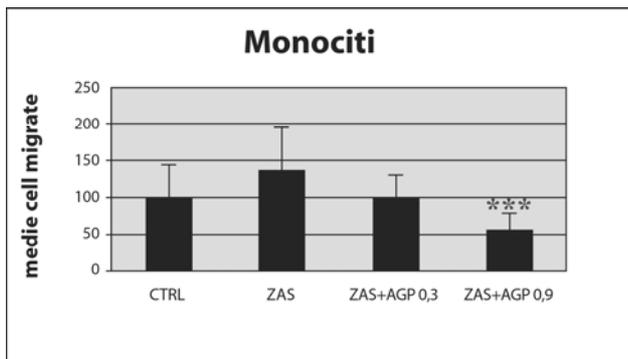
I dati relativi alla citometria dei neutrofilii sono ancora preliminari, poiché gli esperimenti sono stati condotti solo su un individuo.

I risultati riportati in questo lavoro preliminare confermano l'ipotesi che la AGP, come altre proteine di fase acuta (Zhong, 1998), abbia un ruolo nel ridurre gli effetti dannosi del processo infiammatorio. Rimane da chiarire se l'azione della AGP riguarda tutti i monociti oppure una specifica popolazione.

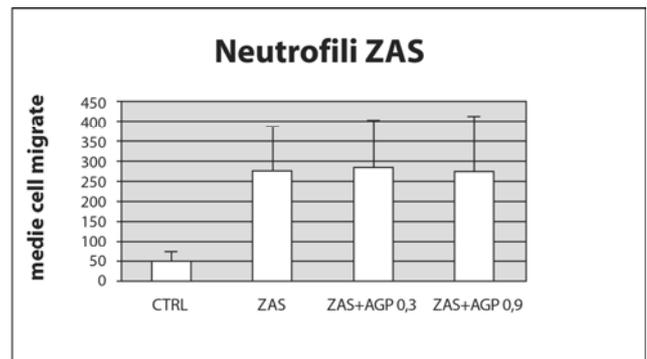
BIBLIOGRAFIA

1. Cecilian F, Pocacqua V, Miranda-Ribera A, Bronzo V, Lecchi C, Sartorelli P. Alpha(1)-Acid glycoprotein modulates apoptosis in bovine monocytes. 2007, *Vet. Immunol. Immunopathol.* 116, 145-52.
2. Costello MJ, Gewurz H, Siegel JN. Inhibition of neutrophil activation by alpha1-acid glycoprotein. 1984, *Clin Exp Immunol.* 55, 465-72.
3. Eckersall PD, Young FJ, McComb C, Hogarth CJ, Safi S, Weber A, McDonald T, Nolan AM, Fitzpatrick JL. Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis. (2001) *Vet. Rec.* 148:35-41.

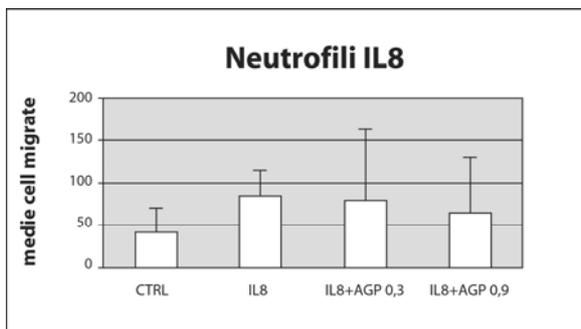
4. Gahmberg CG, Valmu L, Fagerholm S, Kotovuori P, Ihanus E, Tian L, Pessa-Morikawa T. Leukocyte integrins and inflammation. (1998) *CLMS* 54, 549-555.
5. [Harris ES](#), [McIntyre TM](#), [Prescott SM](#), [Zimmerman GA](#). The leukocyte integrins. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 23409-12.
6. [Hocheleid T](#), [Berger FG](#), [Baumann H](#), [Libert C](#). Alpha(1)-acid glycoprotein: an acute phase protein with inflammatory and immunomodulating properties. 2003, [Cytokine Growth Factor Rev.](#) 14, 25-34.
7. Horadagoda NU, Knox KMG, Gibbs HA, Reid SWJ, Horadagoda A, Edwards SER, Eckersall PD (1999) *Vet. Rec.* 144, 437-441.
8. [Lainé E](#), [Couderc R](#), [Roch-Arveiller M](#), [Vasson MP](#), [Giroud JP](#), [Raichvarg D](#). Modulation of human polymorphonuclear neutrophil functions by alpha 1-acid glycoprotein. 1990, *Inflamm.* 14, 1-9.
9. Lamote I, Meyer E, De Ketelaere A, Duchateau L, Burvenich C. Influence of sex steroids on the viability and CD11b, CD18 and CD47 expression of blood neutrophils from dairy cows in the last month of gestation. 2006, *Vet. Res.* 37, 61-74.
10. Liu Y, Merlin D, Burst SL, Pochet M, Madara JL, Parkos CA. 2001, *J. Biol. Chem.*, 276, 40156-66.
11. Mazzone A, Ricevuti G. 1995, *Haematolog.* 80, 161-175.
12. [Nagahata H](#). Bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD): a review. 2004, *J. Vet. Med. Sci.* 66, 1475-82.
13. Nakamura T, Board PG, Matsushita K, Tanaka H, Matsuyama T, Matsuda T. α 1-acid glycoprotein expression in human leukocytes: possible correlation between α 1-acid glycoprotein and inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis. 1993, *Inflamm.* 17, 33-45.
14. Singh VK, Fudenberg HH. Lymphocyte stimulation in vitro by orosomucoid glycoprotein. 1986, *Immunol. Lett.* 14, 9-13.
15. Smits E, Burvenich C, Guidry AJ, Massart-Leen A. 2000, *Vet. Immunol. Immunopathol.* 73, 255-265.
16. Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. (1990) *Nature* 346, 425-434.
17. Zhong W, Zen Q, Tebo J, Schlottmann K, Coggeshall, Mortensen RF. Effect of human C-reactive protein on chemokine and chemotactic factor-induced neutrophil chemotaxis and signalling. 1998, *J Immunol.* 161, 2533-40.



A



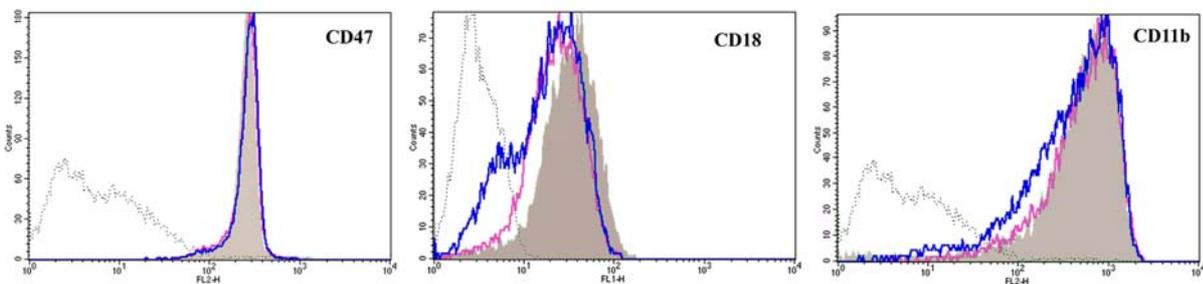
B



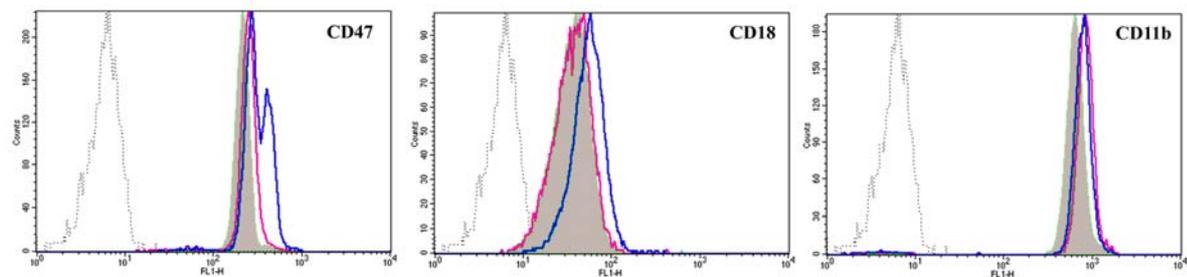
C

Figura 1

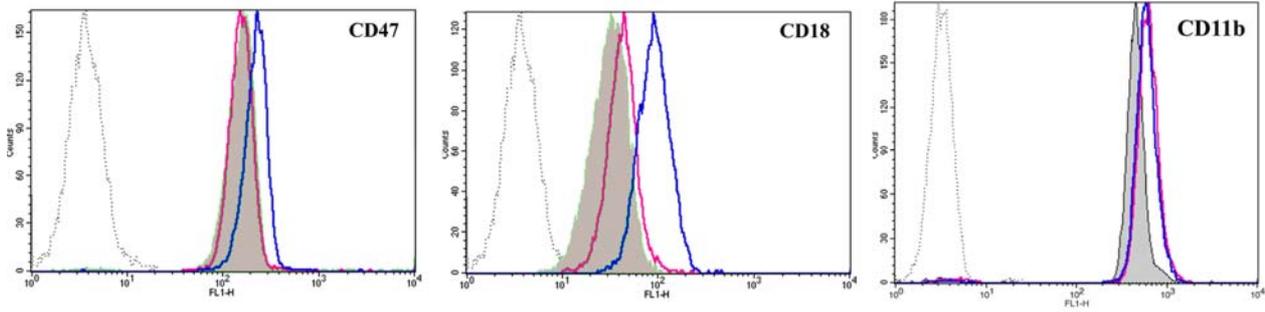
Effetto della boAGP sulla risposta chemotattica di monociti (A) e neutrofili (B-C) verso lo ZAS/rhIL8. I risultati rappresentano la media di 8 esperimenti per i monociti e di 6 esperimenti per i neutrofili.



A



B



C

Figura 2

Analisi degli antigeni di membrana CD47, CD11b e CD18 mediante citometria a flusso

- A. monociti
- B. neutrofilii stimolati con rh-IL8
- C. neutrofilii stimolati con ZAS

Legenda

-  ZAS/IL8 + boAGP 0.9 mg/ml
-  ZAS/IL8
-  Cellule non stimolate
-  Controllo isotipico

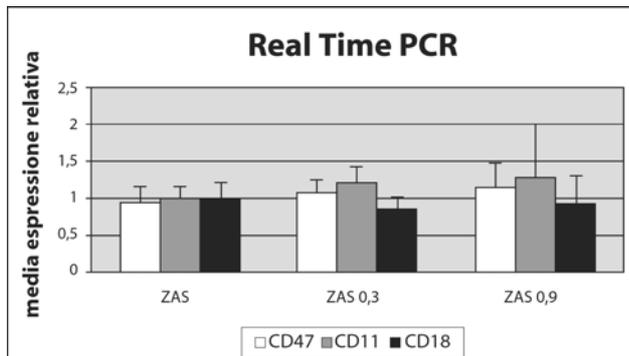


Figura 3

Effetto della boAGP sull'espressione dell'mRNA del CD11b, CD47 e CD18 dei monociti.

EFFECT OF BOVINE ALPHA-1-ACID GLYCOPROTEIN ON BOVINE NEUTROPHILS AND MONOCYTES CHEMOTAXIS AND ON CD11B, CD18 AND CD47 EXPRESSION

Alpha-1-acid glycoprotein (AGP) behaves as an acute phase protein in many species, its serum concentration increasing in response to tissue injury, systemic inflammation and infection.

AGP can bind and transport several small hydrophobic molecules, meanwhile exerting immunomodulatory functions, in particular on blood cells. The aim of this study was to investigate the possible activity of boAGP on blood cells (monocytes and granulocytes) chemotaxis. The effect of two concentrations of boAGP (similar to those found in physiological status or in systemic reaction) on chemotaxis toward IL8 and ZAS was studied in a Boyden modified chamber. In order to explain the possible mechanism of chemotaxis modulatory activity, we evaluated also the mRNA expression of CD11b, CD18 and CD47 by Real time PCR and flow cytometry. We found that no significantly modifications were observed in neutrophils, while monocytes chemotaxis was significantly reduced ($P < 0.001$) when cells were incubated with high concentration of boAGP. In addition boAGP treatment decreased the production of CD18 mRNA, but not of CD11b and CD47. Those results were confirmed also by flow cytometry: the expression of CD18 on monocytes membrane is down-regulated by boAGP.

Moreover, binding of boAGP to cellular membrane of monocytes was demonstrated by fluorescence microscopy.

Our results extended previous findings on the immunomodulatory activity of boAGP and support the hypothesis that boAGP influences the migration of bovine monocytes by modulating the production of beta2-integrin subunit CD18.

Key words: AGP, chemotaxis, Acute Phase Protein, bovine, beta-2 integrin.

ALLESTIMENTO DI CONTROLLI POSITIVI PER LA VALUTAZIONE DI ANTICORPI PRIMARI ANTI-BATTERI IN TEST IMMUNOISTOCHEMICI

Recordati Camilla¹, Radaelli Enrico¹, Lombardi Guerino², Scanziani Eugenio¹

¹Sezione di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviaria, Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Milano; ²Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia

L'indagine immunohistochemica è una metodica diagnostica utile nell'identificazione di malattie batteriche in patologia veterinaria. Di fronte ad un nuovo anticorpo anti-batterico da testare il principale ostacolo da affrontare è il reperimento di adeguati campioni istologici da utilizzare come controlli positivi per la messa a punto della metodica e per la valutazione della specificità degli anticorpi. Noi descriviamo un semplice metodo per allestire campioni istologici contenenti batteri da utilizzare come controllo: il sandwich, costituito da due strati esterni di polmone di cavallo e da uno strato centrale di batteri. In questo modo sono stati allestiti controlli istologici contenenti *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter fetus* che sono stati successivamente colorati con i rispettivi anticorpi. Il presente metodo si è dimostrato efficace ed assicura la presenza di elevate quantità di un'unica specie batterica nota in un campione istologico fissato e processato secondo le stesse modalità dei campioni diagnostici.

Parole chiave: immunohistochemica, controllo positivo, anticorpi antibatterici

INTRODUZIONE

In patologia veterinaria l'indagine immunostochimica rappresenta un metodo diagnostico utile ed efficace per identificare la presenza di batteri patogeni nei tessuti di animali. Tale metodica presenta dei vantaggi rispetto ad altre metodiche (come l'isolamento batterico o la PCR) perché permette di determinare la precisa localizzazione di un microrganismo in un tessuto e di valutare la relazione tra la presenza di tale microrganismo e la risposta dell'ospite (in particolare la presenza di batteri associati ad una lesione) consentendo una migliore valutazione di tipo diagnostico e patogenetico.

Di fronte ad un nuovo anticorpo anti-batterico da testare il principale ostacolo da affrontare è il reperimento di adeguati campioni istologici da utilizzare come controlli positivi per la messa a punto della metodica e per la valutazione della specificità degli anticorpi. Inoltre, come qualsiasi altra prova sierologica, l'immunostochimica necessita di opportuni controlli positivi e negativi per ogni test effettuato (Burry, 2000)

La valutazione della specificità di un anticorpo è indispensabile per una corretta interpretazione dei risultati e si basa sulla dimostrazione che l'anticorpo testato si lega solamente all'immunogeno impiegato per la sua produzione (Petrusz et al., 1976; Swaab et al., 1977; Mills, 1992; Burry, 2000; Miller, 2002). Per valutare la specificità di un anticorpo si utilizza un tessuto di controllo contenente l'antigene noto (Burry, 2000). La prova di specificità è quindi fondamentale nella valutazione di anticorpi anti-batteri di natura policlonale perché sono prodotti per inoculazione di conigli che possono avere nel loro siero anticorpi diretti verso batteri che frequentemente infettano tale specie animale e con cui sono venuti precedentemente a contatto, come ad esempio *Escherichia coli* (Miller, 2002). La presenza di questi anticorpi "di background" può portare ad un'errata interpretazione dei risultati di una prova immunostochimica a scopo diagnostico.

In questo studio noi descriviamo un semplice metodo per allestire campioni istologici contenenti batteri noti da utilizzare come campione di controllo positivo: il sandwich. Una volta allestiti una serie di controlli batterici positivi, per valutare la loro riuscita li abbiamo utilizzati come campioni di controllo nella messa a punto della diluizione d'uso e nella verifica della specificità di alcuni anticorpi anti-batteri policlonali di coniglio.

MATERIALI E METODI

Il sandwich è composto da due strati esterni di polmone di cavallo e da uno strato centrale di batteri. I polmoni di cavallo sono stati prelevati al macello e utilizzati entro 24 ore dalla macellazione. I batteri utilizzati come controllo sono stati seminati in coltura pura su piastre di agar sague e incubati in aerobiosi a 37°C per 24-48 ore. Sono state utilizzate colture batteriche di *Staphylococcus aureus* (Dr.ssa A. Invernizzi, IZSLER Milano), *Escherichia coli* K99- (Dr.ssa A. Invernizzi, IZSLER Milano), *Pasteurella multocida* (Dr. G. Lombardi, IZSLER Brescia), *Mannheimia haemolytica* (Dr. G. Lombardi, IZSLER Brescia), *Arcanobacterium pyogenes* (Dr. G. Lombardi, IZSLER Brescia), *Campylobacter jejuni* ATCC 49943 (Dr.ssa A. Invernizzi, IZSLER Milano) e *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* [sheep abortion Abdn1076, Scotland (Dr.ssa A. De Cesare, Bologna)]. Per allestire i sandwich, dai polmoni di cavallo sono state prelevate mediante una lama da microtomo due sezioni seriali di polmone dello spessore di circa 0,5 cm (fig. 1). Le sezioni rimosse sono state poste su un piano, sovrapposte e rifilate in modo da ottenere un rettangolo di circa 2 x 3 cm. Le due sezioni sono state quindi spalmate sulla loro superficie interna con le colture batteriche pure, utilizzando un'ansa da batteriologia adeguatamente sterilizzata (fig. 2). Le sezioni spalmate, giustapposte e suturate ai quattro lati con filo da sutura (di tipo intrecciato) (fig. 3) sono state poste in biocassette e fissate in formalina tamponata al 10% per 24 ore. Dopo l'inclusione, dal campione impregnato di paraffina e mediante una lama da microtomo sono stati eliminati i punti di sutura e sono state tagliate delle sezioni seriali trasversali di circa 3 mm di spessore. Le sezioni trasversali (in numero di 2 o 3) sono state poste in uno stampo metallico e incluse in un blocco di paraffina (fig. 4). Per ogni ceppo batterico sono stati allestiti più sandwich (2 o 3).

Previa valutazione delle sezioni colorate con Ematossilina-Eosina (EE) per verificare la presenza di batteri nelle sezioni, i controlli positivi così preparati sono stati utilizzati in prove immunostochimiche per la messa a punto della diluizione d'uso (definita come diluizione con la quale si ha la massima intensità del segnale positivo dei batteri omologhi in presenza del minimo/assente segnale di fondo del tessuto polmonare) e per la verifica della specificità di alcuni anticorpi primari policlonali prodotti in coniglio sia di provenienza commerciale [*E. coli* (Dako); *Helicobacter pylori* (Dako)] sia prodotti da uno degli autori [*P. multocida*, *M. hemolytica*, *A. pyogenes* (Dr. G. Lombardi)]. L'anticorpo anti-*H. pylori* (Dako) è stato valutato utilizzando campioni contenenti *Campylobacter* spp. (*C. fetus* e *C. jejuni*), in quanto è noto che anticorpi (monoclonali o policlonali) prodotti nei confronti di una

delle due specie siano in grado di identificare entrambe le specie batteriche. Per quanto riguarda la prova di specificità, i sieri selezionati sono stati testati su controlli positivi batterici contenenti *S. aureus*, *E. coli*, *P. multocida*, *M. haemolytica* e *A. pyogenes*. Le prove immunostochimiche sono state eseguite mediante il metodo avidina-biotina-perossidasi (ABC), utilizzando come cromogeno la DAB. Per la valutazione di tutti i sieri indagati, ad eccezione dell'anti-*H. pylori* (Dako), è stato eseguito uno smascheramento antigenico in tampone citrato pH 6 per 15' a 96°C in bagnetto termostato.

RISULTATI

La valutazione mediante colorazione EE dei campioni istologici ottenuti con il metodo del sandwich ha messo in evidenza sezioni costituite da 2 strati esterni di polmone con uno strato centrale di batteri di spessore variabile a seconda del campione e della sezione esaminata. Raramente, in alcune delle sezioni erano presenti batteri in quantità minime oppure i batteri erano del tutto assenti. I campioni ritenuti idonei sono stati utilizzati come controlli positivi batterici per le prove immunostochimiche di diluizione degli antisieri policlonali selezionati. La prova di specificità degli antisieri policlonali nei confronti di *S. aureus*, *E. coli*, *P. multocida*, *M. haemolytica* e *A. pyogenes* è stata effettuata utilizzando le diluizioni d'uso ricavate per ciascun anticorpo ed ha dimostrato come tutti gli antisieri indagati contenessero anticorpi diretti verso *S. aureus* e, ad eccezione dell'antisiero anti-*H. pylori* (Dako), anche verso *E. coli*, *P. multocida*, *M. haemolytica* e *A. pyogenes* (tabella 1).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il presente metodo per produrre controlli positivi batterici si è dimostrato efficace ed assicura la presenza di elevate quantità di un'unica specie batterica nota in un campione istologico fissato e processato secondo le stesse modalità dei campioni diagnostici. La produzione di sandwich multipli per ciascun ceppo batterico e l'inclusione di 2 o 3 sezioni per blocco di paraffina si è dimostrata necessaria perché la quantità di batteri è risultata variabile a seconda delle sezioni esaminate.

La scelta del polmone di cavallo per allestire i sandwich è stata fatta in base ad alcune caratteristiche fisiche che lo rendono un buon substrato: elastico

(facilmente spalmabile) e spugnoso (buona capacità di assorbimento dei batteri sulla superficie).

Per quanto riguarda la specificità dei sieri policlonali prodotti in coniglio il presente studio ha dimostrato la presenza in tutti gli antisieri testati di anticorpi "aspecifici" diretti verso numerosi batteri, come *S. aureus*, *E. coli*, *P. multocida*, *M. haemolytica* e *A. pyogenes*. La presenza di tali anticorpi è riconducibile all'immunizzazione naturale del coniglio produttore di antisiero nei confronti di batteri di comune riscontro in tale specie (Miller, 2002). Tra gli antisieri testati l'anticorpo policlonale anti-*H. pylori* (Dako) si differenzia rispetto agli altri antisieri perché pur lavorando ad una diluizione d'uso molto inferiore (1:1.000 rispetto a 1:20.000-40.000) ha mostrato di reagire solamente nei confronti di *S. aureus*. Questa differenza è probabilmente imputabile al differente metodo di produzione dell'anticorpo che è stato preparato inoculando solo antigeni termostabili di *H. pylori* ed è stato ulteriormente purificato da anticorpi contaminanti mediante estrazione in fase solida (<http://www.dako.it>). Al contrario gli altri antisieri testati sono stati preparati inoculando lisati batterici o batteri interi inattivati e sono costituiti o da una frazione immunoglobulinica purificata [*E. coli* (Dako)] o da siero intero di coniglio. Con entrambi questi ultimi due metodi di preparazione possono essere comunque presenti anticorpi diversi da quelli specifici (Mills, 1992).

Nella messa a punto di un anticorpo policlonale anti-batterico è quindi di fondamentale importanza disporre di adeguati controlli positivi per definire la corretta diluizione di utilizzo e per verificarne la specificità.

BIBLIOGRAFIA

- Burry R. W. 2000. Specificity controls for immunocytochemical methods. *J Histochem Cytochem* 48:163-165.
- Miller K. 2002. Immunocytochemical techniques. In: Bancroft JD, Gamble M. *Theory and Practice of Histological Techniques*. Fifth edition. Churchill Livingstone (Elsevier). pp 421-464.
- Mills B. 1992. Immunohistochemistry. In: Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sobin LH. *Laboratory methods in histotechnology*. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, D.C. pp 247-251.
- Petrusz P, Sar M, Ordonneau P, DiMeo P. 1976. Specificity in immunocytochemical staining. *J Histochem Cytochem*. 24: 1110-1112.
- Swaab DF, Pool CW, Van Leeuwen FW. 1977. Can specificity ever be proven in immunocytochemical staining? *J Histochem Cytochem*. 25:388-390.

Tabella 1 – Prova di specificità di antisieri policlonali

Antisiero policlonale (ditta produttrice)	Diluizione d'uso	Controlli positivi batterici				
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. multocida</i>	<i>M. haemolytica</i>	<i>A. pyogenes</i>
<i>E. coli</i> (Dako)	1:20.000	+++	+++	+++	+++	+
<i>H. pylori</i> (Dako)	1:1.000	+++	-	-	-	-
<i>P. multocida</i>	1:30.000	+++	++	+++	+++	+
<i>M. haemolytica</i>	1:30.000	+++	++	+++	+++	+++
<i>A. pyogenes</i>	1:40.000	+++	+++	+++	+++	+++

Intensità del segnale: - : assente; +/-: minimo; +: lieve; ++: moderato; +++: intenso

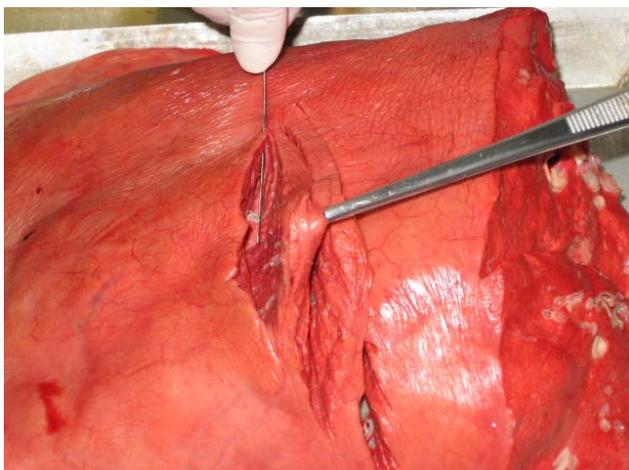


Figura 1. Prelievo di 2 sezioni seriali di polmone di cavallo mediante lama da microtomo.

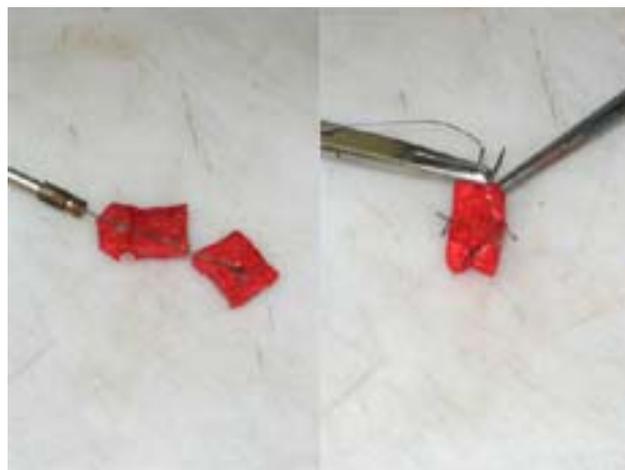


Figura 2. Le sezioni seriali di polmone dopo essere state ritagliate in un rettangolo di 2 x 3 cm vengono spalmate con una cultura batterica pura e suturate insieme mediante punti di sutura.



Figura 3. Blocchetti in paraffina contenenti sezioni trasversali multiple di sandwich.

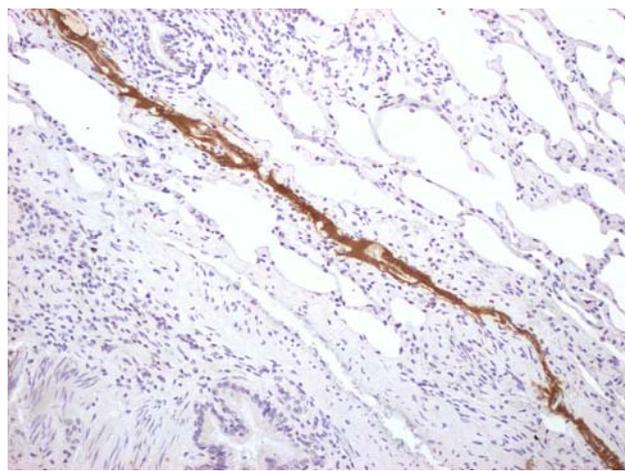


Figura 4. Sandwich *A. pyogenes* colorato con antisiero policlonale anti-*A. pyogenes* (IZSLER) (DAB-emallume, 4x).

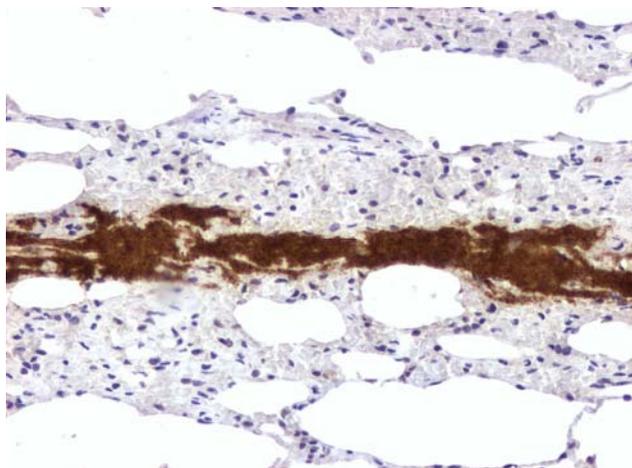


Figura 5. Sandwich *M. haemolytica* colorato con antisiero policlonale anti-*E. coli* (DAKO) (DAB-emallume, 20x).

A SIMPLE METHOD FOR THE PRODUCTION OF POSITIVE CONTROLS FOR THE EVALUATION OF ANTI-BACTERIA PRIMARY ANTIBODIES IN IMMUNOHISTOCHEMICAL ASSAYS

Immunohistochemical assay is a useful diagnostic tool for the identification of bacterial diseases in veterinary pathology. To validate an anti-bacteria antibody it is important to have a suitable sample that act as positive control for the set up of the assay and the assessment of specificity of the antibody. We describe a simple method for the production of bacterial histological control samples: the sandwich. The sandwich is composed of two external layers of equine lung parenchyma with a central layer of the target bacterium. Pure bacterial cultures obtained from blood agar plates incubated for 24-48 hour are spread on 0,5 x 2 x 3 cm lung sections, that are then piled up and sewed together. The sandwich is placed in a tissue cassette and formalin fixed. After tissue processing, the sandwich forms a firm mass from the impregnation of wax. The suture knots are trimmed off, and transverse sections 3 mm thick are serially cut from the sandwich using a microtome blade. The transverse sections are placed on a metal mould for paraffin embedding. We prepared sandwiches containing *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter fetus*, *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica* and *Arcanobacterium pyogenes* and tested them with suitable antibodies. The sandwich is an effective and simple method to prepare bacterial histological controls fixed and processed in the same way as the diagnostic tissues.

Key words: immunohistochemistry, positive control, anti-bacteria antibodies.

IMPIANTO DI CELLULE STAMINALI EMBRIONALI OVINE IN LESIONI CARTILAGINEE: OSSERVAZIONI PRELIMINARI

¹Rocca Stefano, ¹Antuofermo Elisabetta, ³Dattena Maria, ²Manunta Maria Lucia, ³Pilichi Susanna,
¹Floriana Meloni, ¹Leoni Antonio

¹Dipartimento di Patologia e Clinica Veterinaria, Sezione di Patologia generale e Anatomia Patologica,
Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Sassari

²Dipartimento di Patologia e Clinica Veterinaria, Sezione di Clinica Chirurgica Facoltà di Medicina
Veterinaria, Università degli Studi di Sassari

³AGRIS – Istituto Zootecnico e Caseario per la Sardegna, Olmedo, Sassari

La cartilagine articolare è un tessuto di difficile rigenerazione. È noto infatti che, una volta danneggiata, i processi riparativi non portano ad un completo ripristino delle funzionalità e delle strutture preesistenti. Ciò in gran parte dipende dall'assenza di vascolarizzazione, dal lento ricambio cellulare, dall'incapacità da parte dei mediatori dell'infiammazione di raggiungere la sede del danno cartilagineo. È poi noto che la funzionalità articolare può essere compromessa anche da piccole lesioni che progredendo, possono determinare patologie altamente invalidanti. Il trattamento di tali forme è complesso e le tecniche chirurgiche attualmente in uso, non consentono di ottenere risultati soddisfacenti a lungo termine in quanto determinano la sola formazione di tessuto fibro-cartilagineo. Obiettivo del presente lavoro è stato valutare se cellule staminali di origine embrionale, impiantate in lesioni cartilaginee articolari sperimentalmente indotte, possono differenziarsi in condrociti e se la cartilagine neoformata appare simile alla cartilagine ialina articolare. Per modello sperimentale è stata utilizzata la specie ovina sia per la produzione che per l'impianto delle cellule staminali. La valutazione delle lesioni e dei processi riparativi è stata eseguita a 1, 2 e 6 mesi dall'impianto, tramite esami istopatologici, prove immunoistochimiche per il collagene di tipo II e tests di ibridazione *in situ* per confermare l'origine staminale delle cellule differenziate. Come controllo si valutava l'evoluzione del processo riparativo in lesioni senza impianto di cellule staminali e con l'impianto di solo Tissucol. Dai risultati ottenuti si è confermata l'origine staminale delle cellule differenziate; inoltre i processi riparativi osservati hanno mostrato una chiara evoluzione delle cellule impiantate verso la linea condrocitica e, più raramente, fibrocitica.

Parole chiave: cellule embrionali staminali ovine, ibridazione *in situ*, immunoistochimica

TRANSPLANTATION OF SHEEP EMBRYONIC STEM CELLS IN CARTILAGE LESIONS: PRELIMINARY OBSERVATIONS

Once damaged, joint cartilage never completely regenerates. This is due to absence of vascularisation, slow cellular turnover and impossibility for inflammation mediators to reach the cartilage lesion. Even small lesions involve alteration in joint functionality and can cause invalidating pathologies. Treatment is complex and the surgical techniques used to repair the joint surfaces do not give satisfactory and durable results because the new tissue produced is fibrous cartilage. The aim of this study is to evaluate whether ovine embryonic stem cells transplanted in experimental lesions can differentiate into chondrocyte cells and if the new cartilage is of ialine type. For that purpose, we used the ovine species. The evaluation of reparative tissue was performed 1, 2 and 6 months after cell inoculation with histological, immunohistochemical and *in situ* hybridization methods. Bare lesions and Tissucol-implanted lesions were used as controls. Results confirm the stem origin of the reparative tissue with stem cells differentiating prevalently into chondrocytes and rarely into fibrocytes.

Key words: ovine embryonic stem cell, *in situ* hybridization, immunohistochemistry



TRASFERIMENTO DI EMBRIONI OTTENUTI MEDIANTE TECNICHE DI RIPRODUZIONE ASSISTITA NELLA SPECIE OVINA: ANOMALIE MORFOLOGICHE E VASCOLARI DURANTE LA FASE INIZIALE DELLA GRAVIDANZA

Palmieri Chiara¹, Borowicz Pawel³, Reynolds Lawrence³, Ptak Grazyna², Loi Pasqualino², Daniela Malatesta¹, Della Salda Leonardo¹

^{1,2}*Dipartimento di Scienze Biomediche Comparate, ¹Sezione di Patologia Generale ed Anatomia Patologica Veterinaria, Università degli Studi di Teramo*

³*Center for Nutrition and Pregnancy, Department of Animal & Range Sciences, North Dakota State University, Fargo, ND, 58105-5727, USA*

Un corretto sviluppo placentare risulta fondamentale per la crescita fetale intrauterina e spesso gravidanze ottenute mediante tecniche di riproduzione assistita (ARTs) mostrano segni di ipofunzionalità placentare correlate ad anomalie vascolari. Gli embrioni derivanti da SCNT (Somatic Cell Nuclear Transfer) e gli embrioni monoparentali rappresentano modelli di studio dei difetti di placentazione. Tali modelli sono stati utilizzati nel presente lavoro, valutando le caratteristiche morfologiche e vascolari placentari dal 20° al 23° giorno di gravidanza, che rappresenta una fase critica dell'iniziale vascolarizzazione. Sono stati raccolti campioni di caruncole, membrane corionallantoidee (CAM) e, laddove presenti, embrioni, dopo accoppiamento naturale (controlli - CTR) (n=5), gravidanze ottenute mediante IVF (fertilizzazione in vitro) (n=7) e dopo trasferimento di embrioni partenogenoti attivati in vitro (IVA) (n=5). Si è osservata una drastica riduzione delle percentuali di successo di embrioni ottenuti mediante IVA (con segni di iposviluppo), ed elevate percentuali di riassorbimento embrionale (80% IVA, 42,8% IVF, 20% CTR). L'analisi istologica ha mostrato un corretto sviluppo delle caruncole, ma gravi segni di degenerazione delle membrane fetali in caso di IVA. Sono stati inoltre valutati i seguenti parametri vascolari (analisi quantitativa su sezioni marcate con PCNA): densità dell'area (CAD), del numero (CND) e della superficie (CSD) dei capillari. Le caruncole prelevate da gravidanze naturali hanno mostrato un maggior valore di CAD, CND e CSD rispetto ad IVF ed IVA ($p < 0.05$). Lo sviluppo vascolare placentare risulta, quindi, compromesso nelle fasi iniziali della gravidanza di embrioni ottenuti mediante ARTs e ne potrebbe rappresentare la causa delle conseguenti anomalie di sviluppo e dell'alto tasso di riassorbimento embrionale.

Parole chiave: ovino, placenta, vascolarizzazione, tecniche di riproduzione assistita

TRANSFER OF OVINE EMBRYOS OBTAINED THROUGH ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNIQUES: MORPHOLOGICAL AND VASCULAR ANOMALIES DURING EARLY PREGNANCY

Fetal growth depends on the development of a normal placenta and often pregnancies obtained from ARTs show placental defects, owed to vascular anomalies. SCNT and monoparental embryos provide important models for studying placental insufficiency. We have used these models for evaluating their morphological and vascular features from 20th to 23rd days of pregnancy, critical time for early vascularity. Maternal caruncles, chorioallantoic membranes and, if present, embryos from natural mating (n=5), after IVF (n=7) and after transfer of in vitro activated parthenogenotes (IVA, n=5) have been collected. IVA embryos showed higher resorption (80% IVA, 42,8% IVF, 20% CTR) and reduced development than IVF and controls. The histological analysis have demonstrated a normal caruncular development, but high degenerative changes in the IVA fetal membranes. The vascular parameters evaluated (by means of quantitative analysis on PCNA labelled sections) were: capillary area density (CAD), capillary number density (CND), capillary surface density (CSD). Caruncles obtained from natural mating showed higher CAD, CND and CSD than IVF and IVA ($p < 0.05$). This study demonstrates that the placental vascular development is compromised in the early pregnancy obtained from ARTs and should be considered as important factor for related high rate of embryonal death.

Key words: ovine, placenta, vascularity, assisted reproductive techniques



RILIEVI ISTOPATOLOGICI ED IMMUNOISTOCHEMICI IN FETI BOVINI ABORTITI IN FRIULI VENEZIA GIULIA

Pittioni Eugenio*, Pascotto Ernesto*, Galeotti Marco*

**Dipartimento di scienze animali, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Udine*

Il presente studio illustra i risultati ottenuti tramite metodiche istochimiche ed immunoistochimiche su sezioni di organi di 53 feti bovini abortiti. I campioni oggetto dello studio provengono da prelievi necroscopici effettuati in campo da veterinari liberi professionisti nel periodo aprile 2003 – novembre 2006. I risultati ottenuti hanno permesso di suddividere i casi valutati nei seguenti raggruppamenti eziologici: casi con lesioni e rilievi immunoistochimici attribuibili ad agenti virali (9 casi), ad agenti batterici (13 casi), a micosi (2 casi), ad agenti abortigeni non infettivi (1 caso). 15 casi presentavano lesioni a cui non è stato possibile attribuire un agente causale mentre 13 casi non presentavano lesioni.

La diagnosi, in base a quanto osservato, è stata possibile in 25 casi pari al 47% dei casi esaminati. L'organo maggiormente interessato da lesioni è risultato essere la placenta, seguita dagli organi emolinfopoietici e dall'intestino tenue.

Lo studio, in relazione al buon successo diagnostico ottenuto, sottolinea l'importanza dell'indagine microscopica in caso di aborto bovino. È una prima, anche se preliminare, interpretazione del fenomeno aborto bovino nel territorio del Friuli Venezia Giulia.

Parole chiave: aborto immunoistochimica feto bovino istopatologia

INTRODUZIONE

L'aborto è un evento drammatico che incide in modo consistente sull'economia e igiene dell'allevamento bovino e che può, di volta in volta, assumere carattere sporadico, endemico o epizootico. La lotta a tale fenomeno morboso coinvolge tutti gli operatori (allevatore, alimentarista, veterinario d'azienda) del settore, non ultimo l'eventuale anatomopatologo interpellato per una diagnosi eziologica.

La diagnosi risulta particolarmente difficile e complessa in quanto le cause possono essere assai diverse fra loro ed includere sia fattori che riguardano la gestione dell'azienda che agenti infettivi (Benazzi e Marcato 2002). Ugualmente vari e diversi possono essere i metodi di indagine.

Nel presente studio viene valutata la validità del metodo anatomopatologico e delle più classiche metodiche *in situ* (istologia ed immunoistochimica) per la diagnosi di aborti bovini avvenuti in Friuli Venezia Giulia.

MATERIALI E METODI

Sono stati analizzati i campioni di 53 feti bovini abortiti naturalmente e reperiti in stalle della pianura Pordenonese e della zona di Cividale e Valli del Natisone (Nord-est della provincia di Udine) nel periodo aprile 2003 novembre 2007. La necropsopia e la campionatura dei feti è avvenuta in campo ad opera di veterinari liberi professionisti, eccetto per 9 feti inviati interi al laboratorio. Basandosi sulla letteratura presente (Del Piero 2003, Cavarani 1999) gli organi campionati sono stati: lingua, encefalo, timo, polmone, cuore, prestomaci, intestino, fegato, milza, muscolo diaframmatico, cute, placenta. Dopo la fissazione, avvenuta per tempi variabili, la processazione, taglio e colorazione all'ematossilina eosina sono state effettuate secondo le metodiche attualmente in uso. Una preliminare valutazione qualitativa parametrizzata (completezza strutturale dell'organo, dettaglio citoplasmatico e nucleare punteggiati con livelli crescenti da 1 a 5) ha preceduto l'osservazione istologica finalizzata all'individuazione delle eventuali lesioni.

Le eventuali lesioni venivano, per questioni di praticità, suddivise in lesioni di tipo infiammatorio (infiltrati, richiamo di cellule leucocitarie intravasali *etc.*), di tipo regressivo/progressivo – metabolico (iper/ipo plasie/trofie, necrosi, calcificazioni *etc.*) e di tipo circolatorio (emorragie, edemi *etc.*). L'intensità delle lesioni rilevate veniva anch'essa espressa in quinti in

funzione della gravità determinata tramite un protocollo prestabilito.

L'eventuale riscontro di sospette lesioni o patogeni orientava la scelta di ulteriori esami utilizzando colorazioni speciali (GRAM/TWORT per batteri, GROCOTT per funghi, SIRIUS RED per la tipizzazione degli infiltrati eosinofili, PIZZOLATO in caso di cristalli a livello renale) e prove immunoistochimiche. Gli anticorpi nelle prove immunostichimiche utilizzati erano diretti contro: l'Herpes Virus Bovino 1 (BHV1), BVDV, *Listeria monocytogenes* e *Neospora caninum*. I metodi delle prove immunoistochimiche sono a disposizione presso gli autori.

La valutazione parametrica della qualità, le eventuali lesioni istopatologiche e i risultati degli esami successivi venivano registrati su apposito database informatico Open Source (MySQL 5.0 Community Server).

RISULTATI

Dai 53 aborti reperiti, si sono ottenute: 21 serie di campioni di organi con placenta; 2 campioni di placenta senza alcun altro organo; 22 serie di campioni di organo senza placenta; 6 feti interi con placenta; 3 feti interi senza placenta. Da questo materiale, dopo la processazione si sono preparate 693 sezioni istologiche d'organo corrispondenti a 638 organi fetali valutati.

Il livello di conservazione medio dei preparati è risultato soddisfacente con punteggi di 4,6 ($\pm 0,5$) per la completezza strutturale, 2,3 ($\pm 0,8$) per il dettaglio citoplasmatico e 2,6 ($\pm 0,7$) per quello nucleare. Oltre alla prevedibile correlazione negativa (Spearman's rank correlations, RPlot version 1.3) tra il tempo intercorso prima della fissazione ed il dettaglio citoplasmatico ($p = 0,75$; $P < 0,0001$) appare interessante segnalare una debole correlazione positiva tra dettaglio citoplasmatico e momento dell'aborto ($p = 0,39$; $P < 0,005$) che sottolineerebbe come feti abortiti precocemente subiscono maggior autolisi prima di essere espulsi.

Per quanto attiene i quadri istopatologici, ed immunoistochimici riscontrati le lesioni più frequenti erano quelle causate da batteri (13 casi pari al 25% dei casi totali) con una maggior frequenza di placetiti batteriche (5 casi pari al 9% dei casi totali) causate da batteri gram-negativi (3 casi) e gram-positivi (i restanti 2), in ulteriori 3 casi (6%) alla placentite era associata anche polmonite batterica. Alla prova immunoistochimica per la ricerca di *Listeria*

monocytogenes tutti i campioni provenienti da questi casi hanno dato esito negativo.

Lesioni attribuibili alla presenza di virus si sono rilevate in 9 casi (17% della casistica totale). Di questi, 5 presentavano rilievi istopatologici ed immunoistochimici attribuibili alla presenza di BVDV. Si potevano osservare prevalentemente anomalie morfologiche dei villi intestinali associate alla presenza di infiltrati di granulociti eosinofili che peraltro si rilevavano anche a livello timico. La milza mostrava ipoplasia dei noduli linfatici e iperplasia della polpa bianca. Con la metodica immunoistochimica si dimostrava la presenza di antigeni di BVDV a livello delle cellule delle ghiandole delle cripte intestinali e di alcune cellule similistiocitarie nello stroma di vari organi. In 4 casi (7% dei casi totali) di aborto di origine virale, il virus coinvolto risultava essere BHV1 con quadri di placentite ed infiltrati a livello timico. La metodica immunoistochimica permetteva la localizzazione di antigeni virale a livello placentare (tutti i casi) epatico (un caso) e renale (un caso). In un caso alla presenza delle lesioni virali si associava placentite micotica e batterica ed, in un altro, polmonite batterica.

Da segnalare 2 casi (4%) di grave placentite micotica ed un caso ossalosi renale con la presenza di cristalli positivi alla colorazione di PIZZOLATO.

Nei 15 casi non diagnosticati le lesioni apparivano soprattutto di tipo infiammatorio a livello placentare, cerebrale, splenico, timico, cardiaco ed intestinale con aspetti ed intensità diversi.

In base a quanto soprascritto la diagnosi è stata possibile nel 47% dei casi (n=25 casi di aborto su 53), mentre nel 28% si rilevavano lesioni istopatologiche in assenza di diagnosi, nel rimanente 24% non si rilevava alcuna lesione. Tali valori cambiano notevolmente se si considerano solo i casi in cui è stata campionata la placenta (n=29 casi): 69% dei casi (n=20) diagnosticati; 17% (n=5) con lesioni non attribuibili ad alcun agente patogeno; 14% (n=4) senza lesioni.

DISCUSSIONE

I rilievi istopatologici ed immunoistochimici ottenuti nel presente studio ricalcano in massima parte quanto descritto in corso di aborto bovino in generale da Kirkbride (1977; 1985; 1986), Del Piero (2003) ed in particolare da: Johnson et al (1994), Kirkbride (1993) per lesioni batteriche; Baule et al. (2001), Grooms (2006) per le lesioni e rilievi immunoistochimici dovuti a BVDV; Kirkbride (1992) e Smith (1997) per BHV1; Carter et al. (1973) e Johnson et al. (1994) per l'aborto

micotico; Schiefer et Moffatt (1974) per l'ossalosi renale. Anche le lesioni presenti nei casi non diagnosticati vengono già descritte in letteratura (Anderson et al., 1990; Kirkbride, 1992). Anche sotto il profilo eziologico i dati ottenuti appaiono in linea con gli altri studi (Kirkbride, 1977; Cavarani, 1999; Khodacaram et Ikede, 2005). Appare comunque interessante sottolineare come nel presente lavoro, si è rilevata la totale assenza di quadri istopatologici e rilievi immunoistochimici attribuibili a *Neospora caninum*. Questo agente patogeno viene considerato da molti (Anderson et al., 1991; Jamaluddin et al., 1996; Dubey et al., 2002; McEwen et Carman, 2004; Corbellini et al. 2006) una comune causa di aborto bovino in molti paesi compresa l'Italia (Magnino et al., 2001; Duvia, 2002). Tale rilievo può essere parzialmente giustificato con la tipologia di allevamento dalla quale sono pervenuti gli aborti: piccole dimensioni e con poca o nulla rimonta esterna. Infine è da rilevare l'alto successo diagnostico ottenuto con il solo utilizzo dell'istologia e della metodica immunistochemica. Tale risultato (47%) è da collocarsi fra i più alti, considerato che il successo diagnostico in studi simili, ma con l'impiego di più metodiche investigative, appare compreso tra il 54,4% (Kim et al. 2002) ed 15,4% (Thorton 1992).

CONCLUSIONI

Il presente studio ha permesso di confermare l'importanza del campionamento placentare per l'aumento della possibilità di riuscita diagnostica in corso di aborto bovino; organi importanti per la diagnosi sono risultati essere anche polmone, intestino tenue, milza, timo, rene. Dalla letteratura consultata appare comunque sempre consigliabile il campionamento anche del cuore e encefalo. Viene provata la validità di un approccio diagnostico puramente anatomopatologico al fenomeno abortivo. Le indicazioni sull'eziologia degli aborti forniscono un primo e preliminare quadro della situazione in Friuli Venezia Giulia e sembrano dimostrare uno scarso ruolo di *Neospora caninum* quale agente primario di aborto bovino nella regione.

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

BIBLIOGRAFIA

- M. L. **Anderson**; P. C. Blanchard; B. C. Barr; R. L. Hoffman 1990. A survey of causes of bovine abortion occurring in the San Joaquin Valley, California. *J Vet Diagn Invest* 2 (4): 283-287
- M. L. **Anderson**; P. C. Blanchard; B. C. Barr; J. P. Dubey; R. L. Hoffman; P. A. Conrad, 1991. Neosporalike protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc* 198 (2): 241-244
- C. **Baule**; G. Kulcsár; K. Belák; M. Albert; C. Mittelholzer; T. Soós; L. Kucsera; S. Belák, 2001. Pathogenesis of primary respiratory disease induced by isolates from a new genetic cluster of bovine viral diarrhoea virus type 1. *J Clin Microbiol* 39 (1): 146-53
- C. **Benazzi**; P. S. Marcato, 2002. Sistema genitale femminile. In P.S. Marcato: "Patologia Sistematica Veterinaria" pagg. 1030-1043 Ed. Agricole de il Sole24 ORE Edagricole S.r.l Bologna. 2002
- M. E. **Carter**; D. O. Cordes; M. E. di Menna; R. Hunter, 1973. Fungi Isolated From Bovine Mycotic Abortion and Pneumonia With Special Reference to *Mortierella Wolfii*. *Res Vet Sci* 14 (2):201-206
- S. **Cavirani**, 1999. L'aborto infettivo nel bovino, aspetti eziopatogenetici, criteri diagnostici, considerazioni di carattere epidemiologico in allevamenti da latte. *Large Animal Review* 5 (4): 13-24
- F. **DelPiero**, 2003. Aborti infettivi dei ruminanti. *Large Animal Review* 1: 11-27
- J. P. **Dubey**; B. C. Barr; J. R. Barta; I. Bjerkås; C. Björkman; B. L. Blagburn; D. D. Bowman; D. Buxton; et al., 2002. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. *Int J Parasitol* 32 (8): 929-946
- L. G. **Corbellini**; C. A. Pescador; F. Frantz; E. Wunder; D. Steffen; D. R. Smith; D. Driemeier, 2006. Diagnostic survey of bovine abortion with special reference to *Neospora caninum* infection: importance, repeated abortion and concurrent infection in aborted fetuses in Southern Brazil. *Vet J* 172 (1): 114-120
- S. **Duvia**, 2002. Neosporosi bovina: occorrenza di aborti da *N. caninum* in aziende con infezione accertata sierologicamente. *L'osservatorio* 5 2. Consultabile al sito: <http://www.oevr.org/>
- A. A. **Jamaluddin**; J. T. Case; D. W. Hird; P. C. Blanchard; J. R. Peuroi; M. L. Anderson, 1996. Dairy cattle abortion in California: evaluation of diagnostic laboratory data. *J Vet Diagn Invest* 8 (2): 210-218
- C. T. **Johnson**; G. R. Lupson; K. E. Lawrence, 1994. The bovine placentome in bacterial and mycotic abortions. *Vet Rec* 134 (11): 263-266
- A. **Khodakaram-Tafti**; B. O. Ikede, 2005. A retrospective study of sporadic bovine abortions, stillbirths, and neonatal abnormalities in Atlantic Canada, from 1990 to 2001. *Can Vet J* 46 (7): 635-637
- J. H. **Kim**; J. K. Lee; B. C. Lee; B. K. Park; H. S. Yoo; W. S. Hwang; N. R. Shin; M. S. Kang; Y. H. Jean; H. J. Yoon; S. K. Kang; D. Y. Kim, 2002. Diagnostic survey of bovine abortion in Korea: with special emphasis on *Neospora caninum*. *J Vet Med Sci* 64 (12): 1123-1127
- C. A. **Kirkbride**; D. Martinovich; D. A. Woodhouse, 1977. Immunoglobulins and lesions in aborted bovine fetuses. *N Z Vet J* 25 (7): 180-187
- C. A. **Kirkbride**, 1985. Managing an outbreak of livestock abortion -2: diagnosis and control of bovine abortion *Vet. Med.* 80: 70-79
- C. A. **Kirkbride**, 1986. Examination of bovine and ovine fetuses. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2 (1): 61-83
- C. A. **Kirkbride**, 1992. Etiologic agents detected in a 10-year study of bovine abortions and stillbirths. *J Vet Diagn Invest* 4 (2): 175-180
- C. A. **Kirkbride**, 1993. Bacterial agents detected in a 10-year study of bovine abortions and stillbirths. *J Vet Diagn Invest* 5 (1): 64-68
- S. **Magnino**; C. Bandi; P. C. Vigo; C. Bazzucchi; I. DeGiuli; M. Fabbi; C. Genchi, 2001. La neosporosi del bovino: aggiornamento su una malattia emergente. *L'osservatorio* 4 1 Consultabile al sito: <http://www.oevr.org/>
- B. **McEwen**; S. Carman, 2005. Animal health laboratory reports--cattle. Bovine abortion update, 1998-2004. *Can Vet J* 46 (1): 46
- B **Schiefer**; R E Moffatt, 1974. Bovine abortion associated with renal oxalosis in the fetus. *Can Vet J* 15 (3): 57-65
- G. H. **Smith**; J. K. Collins; J. Carman, 1989. Use of an immunoperoxidase test for the detection of bovine herpesvirus-1 in aborted fetal tissue. *J Vet Diagn Invest* 1 (1):39-44
- R. **Thornton** 1992. Bovine abortions - laboratory diagnosis 1991. *Surveillance (Wellington)* 4

	N°	%	N°	%
Eziologia batterica	13	24,6		
placentite batterica			5	9,4
placentite e polmonite batterica			3	5,7
polmonite batterica			4	7,5
placentite e setticemia			1	1,9
Eziologia virale	7	13,2		
BVDV			5	9,4
BHV-1			2	3,8
Eziologia mista	2	3,8		
BHV-1, placentite micotica e polmonite batterica			1	1,9
BHV-1, placentite batterica			1	1,9
Eziologia micotica	2	3,8		
placentite micotica			2	3,8
Altro	1	1,9		
ossalosi renale			1	1,9

Tabella 1. Riassunto dei risultati eziologici ottenuti nello studio (n. 53 feti analizzati).

AUTORE	KIM et al.	CORBELLINI et al.	DATI ORIGINALI	CAMPERO et al.	ANDERSON et al.	McEVEN et CARMAN	JANALUDDIN et al.	RHODAKARAM et I KEDE	KIRKBRIDE	CAVIRANI
NAZIONE	KR	BR	ITA	AR	USA	CA	USA	CA	USA	ITA
ANNO PUBBLICAZIONE	2002	2006	///	2003	1991	2004	1996	2005	1978	1999
ANNO INIZIO STUDIO	1999	2001	2003	1994	1985	1998	1987	1990	1973	1995
ANNO FINE STUDIO	2000	2003	2006	2000	1989	2004	1989	2001	1976	1999
DURATA IN ANNI	1	2	3	6	4	6	2	11	3	4
CAMPIONI	180	161	53	354	468	1698	595	234	2500	473
DIAGNOSTICATI	98	83	25	161	213	730	254	96	964	180
% DIAGNOSTICATI	54,4	51,6	47,2	45,5	45,5	43,0	42,7	41,0	38,6	38,1
NO DIAGNOSI MA LESIONI	???	13	15	101	115	281	69	17	???	???
% NO DIAGNOSI MA LESIONI	0,0	8,1	28,3	28,5	24,6	16,5	11,6	7,3	0,0	0,0

Tabella 2. Confronto dei risultati diagnostici con le altre ricerche presenti in letteratura.

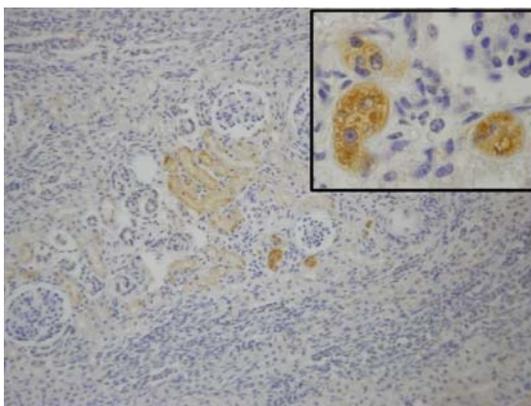


Figura 1. Immagini istologiche a piccolo e forte ingrandimento. Reazione positiva dell'epitelio dei tubuli renali per BHV1 tramite prova immunohistochemica.

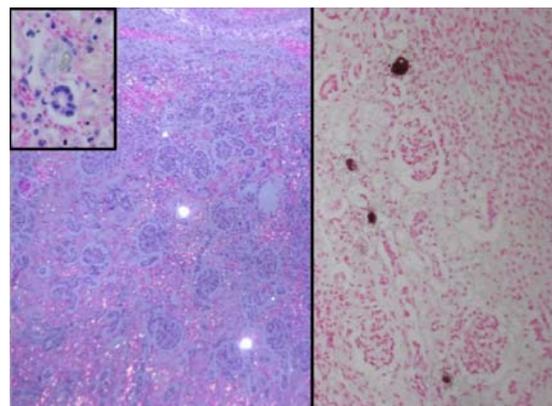


Figura 2. Immagini istologiche relative ad un caso di ossalosi renale. A sinistra osservazione in luce polarizzata (birifrangenza incolore dei cristalli); a destra colorazione di Pizzolato (cristalli di color bruno-nero); in piccolo, in alto a sinistra, colorazione EE.

HISTOPATHOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL FINDINGS IN ABORTED BOVINE FETUS IN FRIULI VENEZIA GIULIA

The present study shows the results obtained via histochemical and immunohistochemical research on samples from 53 bovine fetus naturally aborted in Friuli Venezia Giulia. The samples were collected on field by professional veterinarians between April 2003 and November 2006. A first histological examination allowed for further research's methods to be chosen. The lesions observed can be divided into the following aetiological groups: lesions and immunohistochemical evidence by virus (5 cases by BVD, 4 cases by IBR, 2 of which were with mixed infection); lesions by bacteria (13 cases); micosis (2 cases) and non infectious agents (1 case). 15 cases had lesions but no evidence of any possible agent, 13 cases had no lesions at all. The lesions were most frequently caused by bacteria (placentitis and pneumonia) followed by virus, fungi and non infectious agents. Diagnosis was possible in 25 cases out of 53 (47%). The most damaged organ was placenta followed by haemolymphopoietics organs and intestine.

The study, due to good diagnostical success, encourages the importance of microscopical investigation for diagnosis of bovine abortion. The distribution of lesions observed demonstrates the importance of sampling placenta, lung, intestine, spleen, thymus, kidney, heart and brain tissues. This study gives an initial, if not also complete, interpretation of bovine abortion phenomenon in Friuli Venezia Giulia.

Key words: abortion immunohistochemistry fetus bovine histopathology

TRANSIZIONE EPITELIO-MESENCHIMALE DELLE CELLULE TUBULARI RENALI NELLA GLOMERULONEFRITE MEMBRANOSA E MEMBRANO-PROLIFERATIVA DEL CANE

Aresu Luca ¹, Rastaldi Maria Pia ², Scanziani Eugenio ³, Baily James ⁴, Radaelli Enrico ³, Pregel Paola ¹, Valenza Federico ¹

¹ Dipartimento di Patologia Animale, Università di Torino, Grugliasco (TO), Italia; ² Renal Immunopathology Laboratory, Ospedale San Carlo, Fondazione D'Amico per la Ricerca sulle Malattie Renali, Milano, Itali; ³ Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Università degli Studi di Milano, Milano, Italia; ⁴ Division of Pathological Sciences, Institute of Comparative Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Glasgow, UK

Lo sviluppo della fibrosi renale nel cane è il risultato di un lesione primaria o secondaria ad altre patologie. Nella patologia renale umana è stato dimostrato il coinvolgimento delle cellule epiteliali tubulari nei meccanismi di fibrosi. In questo studio sono state prese in considerazione le modificazioni della componente epiteliale tubulare in due malattie glomerulari nel cane. È stato affrontato uno studio immunostochimico per valutare l'espressione di un *marker* epiteliale (citocheratina), di un *marker* mesenchimale (vimentina), di un *marker* della muscolatura liscia (α -SMA) e di un *marker* di proliferazione cellulare (PCNA) in 20 biopsie renali, caratterizzate da glomerulonefrite membranosa e membrano-proliferativa. I risultati mostrano una riduzione di espressione della citocheratina a livello delle cellule epiteliali tubulari proporzionale al grado di diffusione della fibrosi e indipendente dal tipo di glomerulonefrite. L'espressione del *marker* vimentina a livello dell'epitelio tubulare è risultata di intensità variabile nelle aree di infiammazione ed è stato osservato un numero ridotto di cellule positive all'actina. In entrambe le malattie infiammatorie esaminate, lo studio immunostochimico ha dimostrato una riduzione del *marker* epiteliale a carico dei tubuli renali a livello dei foci di infiammazione cronica e la transizione immunofenotipica da cellule epiteliali a cellule mesenchimali che esprimono la vimentina. L'integrità della membrana basale tubulare sembra essere fondamentale nel mantenimento del fenotipo epiteliale. Il modello animale offre l'opportunità per un lavoro di ricerca sulla fibrosi renale nell'uomo e su eventuali terapie.

Parole chiave: Citocheratina, cane, fibrosi interstiziale, TID, vimentina

EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION (EMT) OF RENAL TUBULAR CELLS IN CANINE MEMBRANOUS AND MEMBRANOPROLIFERATIVE GLOMERULONEPHRITIS

Tubulo-interstitial fibrosis in dogs may result from primary injury to the interstitium or develop secondary to other renal diseases. As in human renal pathology, tubular epithelial cells are believed to actively participate in the mechanisms of renal fibrosis. In this study we examined the changes in the tubular epithelial component in two specific canine diseases at different stages of chronicity. Immunohistochemistry was used to demonstrate the expression of the epithelial marker cytokeratin, the smooth muscle marker alpha smooth muscle actin (α -SMA), the mesenchymal marker vimentin and the proliferation marker Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) in the kidneys of 20 dogs with membranous glomerulonephritis and membrano-proliferative glomerulonephritis. Results showed that the loss of epithelial markers in tubular epithelial cells (TEC) was directly correlated to the grade of tubulo-interstitial disease present and independent of the type of glomerulonephritis. Varying degrees of vimentin positivity were detected in tubular epithelium in areas of inflammation and low numbers of scattered α -SMA positive cells were also observed. Immunohistochemical results showed that epithelial tubular cells lose their cytokeratin staining characteristics and transdifferentiate into cells exhibiting key mesenchymal immunophenotypic feature of vimentin positive staining in both diseases investigated. The integrity of the tubular basement membrane is likely to be fundamental in maintaining the epithelial phenotype of TECs. Animal models provide opportunities for investigating the pathogenesis of renal fibrosis in humans and possible treatment options.

Key words: Cytokeratin, dog, interstitial fibrosis, TID, vimentin

MICROEPATITI NEI SUINI

**Paolo Stefano Marcato, Giuseppe Sarli, Gianfranco Militerno, Serena Panarese, Barbara Bacci,
Antonella Perillo*, Guerino Lombardi****

*Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale. Unibo. Via Tolara di sopra 50. 40064
Ozzano Emilia (BO)*

** Dipartimento di Sanità, Patologia, Farmaco-tossicologia e
Benessere degli Animali, Uniba. 70100 Valenzano (BA)*

*** Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna. Via Bianchi 9. 25124
Brescia*

Una microepatite linfocitaria multifocale in suini clinico-patologicamente silenti è registrata solamente nell'infezione spontanea e sperimentale da HEV (swine *Hepatitis E virus*, fam. *Hepeviridae*). L'infezione subclinica da HEV è dimostrata da studi sieroepidemiologici anche in allevamenti italiani. Pertanto abbiamo voluto verificare se anche in Italia si possono rilevare nei suini equivalenti istologici di microepatiti da HEV. Sono state effettuate indagini microscopiche sul fegato di suini normali alla visita sanitaria ante e post mortem, di suinetti SPF e di suinetti con infezione sperimentale da HEV. Istologicamente una microepatite linfocitaria multifocale (intralobulare e/o perilobulare) ha rilevato per incidenza (41%) su oltre 500 suini regolarmente macellati (224/547), mentre si è attestata al 9% su oltre 300 suinetti SPF (28/307). La percentuale di microepatiti nei suini macellati ha coinciso con quella (41%) di soggetti con feci positive a HEV RNA registrata nel Canada in suini in età da macello. I nostri dati per numerosità casistica non hanno antecedenti in letteratura, tuttavia mancano finora della dimostrazione di un nesso patogenetico con eziologie virali e in particolare con HEV. Abbiamo comunque potuto escludere immunostochimicamente la presenza di antigeni di PCV-2 nelle lesioni dei casi più rilevanti. Inoltre in 8 controlli positivi per infezione sperimentale da HEV abbiamo constatato tipologie di lesioni microepatiche sovrapponibili a quelle dei nostri 252 casi spontanei.

Parole chiave: suini, microepatite linfocitaria, HEV

SWINE MICROHEPATITIS

Pigs naturally infected with swine HEV (swine *Hepatitis E virus*, fam. *Hepeviridae*) have an asymptomatic disease, only histologically diagnosed as a mild lymphoplasmacytic hepatitis. A similar microscopic liver damage is also found in cases of PCV-2 infection, but only in animals clinically affected by PWMS. Seroepidemiological studies have shown that swine HEV infection, ubiquitous worldwide, is also present in Italy. In this study we describe a microscopic hepatitis (multifocal lymphocytic intralobular and/or perilobular hepatitis) in 224/547 (41%) slaughtered pigs, in 28/307 (9%) SPF piglets and in 8 HEV-infected control piglets. PCV-2 immunostaining was negative in slaughtered pigs when tested in livers with microhepatitis lesions of higher degree.

Key words: swine, lymphocytic microhepatitis, HEV

RISULTATI PRELIMINARI DI UN INFEZIONE SPERIMENTALE CON HEV IN SUINETTI NATURALMENTE INFETTI CON CIRCOVIRUS TIPO2

Daniela Gelmetti, Monica Cerioli, Nadia Losio, Roberto Faita, Enrico Pavoni, Andrea Luppi, Paolo Cordioli, Guerino Lombardi

Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lombardia e Emilia Romagna- via Bianchi 9, 25124 Brescia

L'Hepevirus (HEV) causa epatiti nell'uomo, nei primati, nei volatili e nel suino. Indagini sierologiche in allevamenti suini del nord Italia indicano una sieroprevalenza del 10% circa. Nel 2006, nei laboratori dell'IZSLER, è stato caratterizzato un virus HEV di campo, correlato al ceppo europeo BCN12; inoculato in 2 suinetti SPF ha riprodotto la malattia. Scopo del lavoro è valutare l'efficacia della trasmissione oro-fecale in suinetti naturalmente infetti con PCV2, il profilo delle lesioni epatiche, la sensibilità della RT-PCR in diversi organi e materiali biologici. 10 suinetti, erano in esperimento: 4 infettati per os; 4 a contatto, 2 controlli negativi. A 25 g pi è stato sacrificato il suino N°1, e ogni 7 g circa gli altri, fino a 68 g pi. Campioni di fegato, linfonodi e intestino sono stati esaminati in istologia. Gli stessi campioni le feci, il sangue e la bile sono stati esaminati in RT-PCR. Positività in RT-PCR a) animali infettati: le feci dal 1° g pi fino all'exitus; il sangue del suino N°1 a 15 e 18 g pi, il suino N° 8 a 64 g pi; la bile dei suini 1 e 2 rispettivamente a 25 e 27 g pi; ed il fegato del N° 1a 25 g pi. b) contatti: le feci a partire dal 1° g pi, il sangue e il duodeno del N° 5 a 36 e 48 g pi; la milza del N°7 a 67g pi. .

Istologicamente era osservabile, sia negli infettati che nei contatti, epatite linfocitaria lieve, rari epatociti necrotici, sinusoidi dilatati, trama reticolare, a tratti discontinua. Dopo immunocolorazione verso PCV2 nel fegato e nei linfonodi rari macrofagi positivi. I dati preliminari dimostrano il successo della trasmissione oro-fecale (100%) e il decorso asintomatico. La concomitante infezione con PCV2 non sembra aver esacerbato né il quadro istologico né la clinica; RT-PCR è affidabile soprattutto per campioni di feci e di sangue. L'epatite non specifica osservata unitamente alla presenza di una co-infezione, rende necessario l'uso di anticorpi specifici per la diagnosi

Parole chiave: epatite E, HEV, suini, infezione sperimentale, PCV2

PRELIMINARY RESULTS ON EXPERIMENTALLY HEV INFECTION IN YOUNG PIGS NATURALLY INFECTED WITH CIRCOVIRUS TYPE 2

During 2006, a field hepatitis E virus (HEV), correlated to European BCN12 strain, was characterized at IZLER laboratory, and reproduced the disease in two SPF pigs. The aim of this study is to evaluate the success of oral-fecal route in 10 pigs naturally infected with PCV2, the profile of hepatic lesions, the sensibility of RT-PCR in different samples. The first animal was sacrificed at 25 days post infection (dpi) and the last one at 68 dpi. Histology and RT-PCR were performed. RT-PCR positive results a) infected pigs: faeces from the 1° dpi till exitus; blood of pig N°1 at 15 and 18 dpi, N° 8 at 64 dpi; bile of pigs N° 1 and 2 at 25 and 27 dpi; the liver of N° 1 at 25 d pi. b) contact: faeces from 11° dpi, blood and duodenum of N° 5 at 36 and 48 dpi; the spleen of N°7 at 67dpi. Histologically mild lymphocytic hepatitis, reticular fibres discontinuity and occasionally single necrotic hepatocytes were observed. PCV2 immunostaining was positive in liver and lymph-nodes macrophages. Preliminary data show the success of oral-fecal route (100%), PCV2 co-infection did not enhance hepatic lesion and clinical signs. Histologic evidence of non specific hepatitis and the presence of a co-infection let the diagnosis to immunohistochemistry.

Key words: hepatitis E, HEV, swine, experimental infection, PCV2

RILIEVI ANATOMOISTOPATOLOGICI IN CASI DI ANEMIA INFETTIVA EQUINA CLINICAMENTE MANIFESTI

Lepri Elvio, Sforza Monica, Passamonti Fabrizio*, Vitellozzi. Giovanni

Dipartimento di Scienze Biopatologiche ed Igiene delle Produzioni Animali ed Alimentari – Sezione di Patologia e Igiene. Facoltà di Medicina Veterinaria di Perugia

** Dipartimento di Patologia, Diagnostica e Clinica e Veterinaria – Sezione di Scienze Sperimentali e Biotecnologie Applicate. Facoltà di Medicina Veterinaria di Perugia*

L'anemia infettiva equina (AIE) è una malattia da tempo conosciuta nel nostro paese, recentemente tornata alla ribalta per il verificarsi di episodi clinicamente manifesti in cavalli sportivi. Scopo della comunicazione è descrivere le lesioni anatomicoistopatologiche osservate in 10 (7 puledri e 3 adulti) di questi casi.

Le lesioni macroscopiche più comuni sono state: pallore generalizzato, emorragie petecchiali disseminate e modico subittero. Gli organi più costantemente alterati sono risultati i reni, di colore giallastro, consistenza diminuita, con presenza di spruzzature emorragiche e/o focolai biancastri disseminati. Fegato e milza erano modicamente aumentati di volume, così come i linfonodi.

Anche istologicamente le lesioni più evidenti erano nei reni; in tutti i casi era presente una glomerulonefrite che variava da quadri iperacuti con edema, emorragie e necrosi (g. acuta essudativa), a lesioni protratte dominate da ispessimento delle membrane basali (g. membranosa), proliferazione epiteliale e mesangiale (g. proliferativa) o aspetti intermedi (g. membranoproliferativa). Altro frequente rilievo era una nefrite interstiziale che andava da lieve multifocale a grave e diffusa, occasionalmente con formazione di aggregati similfollicolari.

Nel fegato era evidente epatite linfocitaria da periportale a confluyente con istiocitosi dei sinusoidi, eritrofagocitosi ed emosiderosi. Meno comunemente l'emosiderosi si osservava anche a livello splenico e linfonodale.

Nel complesso le lesioni osservate nei vari soggetti sono riferibili a forme acute-iperacute di malattia, mancando quelle più suggestive di forme croniche. In particolare la frequenza e la gravità delle lesioni renali riscontrate indicherebbe l'AIEV come un importante causa di lesioni renali nel cavallo.

Parole chiave: cavallo, anemia infettiva, rene, glomerulonefrite, nefrite interstiziale

ANATOMOHISTOPATHOLOGICAL FINDINGS IN CLINICAL CASES OF EQUINE INFECTIOUS ANEMIA

Interest on equine infectious anemia has been recently renewed in Italy by several clinical cases in sport horses; aim of the report is to describe gross and histologic findings in 10 (7 foals and 3 adults) of these horses.

Most constant gross lesions were pale to icteric tissues and widespread petechiae. Kidney were soft and yellow with diffuse cortical hemorrhages and/or scattered white spots; liver and spleen moderately enlarged, as well as lymph nodes. Histologically the most severe lesions were in kidney with severe glomerulonephritis, ranging from acute exudative, with edema, haemorrhages and necrosis, to more long standing membranous, proliferative or membranoproliferative. Interstitial lymphocytic nephritis varied from mild multifocal to severe diffuse, with occasional pseudofollicles. In the liver a moderate to severe portal lymphocytic hepatitis was associated with histiocytosis of sinusoids and hemosiderosis. Slighter hemosiderosis was present in spleen and lymph nodes.

In most cases the lesions were consistent with peracute-acute form of the disease, lacking the more "typical" features of chronic stages. Interestingly, the most constant and severe lesions were in kidneys, indicating EIAV as an important cause of renal disease in horses.

Key words: horse, infectious anemia, kidney, glomerulonephritis, interstitial nephritis

LESIONI ANATOMOPATOLOGICHE IN UN CASO DI INFEZIONE LETALE DA ENCEPHALOMIOCARDITIS VIRUS (EMCV) IN UN *LEMUR CATT*A

Pascotto Ernesto¹, Gelmetti Daniela², Codolo Roberta¹, Guadagnini Davide³, Magnone William³, Sandri Camillo³, Luppi Andrea², Galeotti Marco¹

¹Università di Udine, Sezione biologia e patologia animale, Dipartimento di Scienze Animali;

²Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna

³Parco Natura Viva – Bussolengo (VR)

Il giorno 4 novembre 2006, presso il Parco Natura Viva di Bussolengo (PNV), un lemure dalla coda ad anelli (*Lemur catta*), maschio, adulto (Arthur), di 1,7 kg, veniva trovato morto senza apparenti lesioni esteriori. Il keeper ed i veterinari del PNV non segnalavano alcuna manifestazione di sofferenza nei giorni precedenti. Si provvedeva quindi all'esame necroscopico con sospetto diagnostico principale di avvelenamento da cumarinici per una concomitante derattizzazione presso gli stabulari. All'apertura del torace si rilevava un discreto versamento lievemente emorragico; nel cuore si constatavano congestione ed emorragie perivasali nel pericardio e lieve megalia con aree biancastre soffuse in sezione; i polmoni apparivano diffusamente enfisematosi ed interessati da uno stato congestizio-emorragico multifocale. All'esame della scatola cranica si notava una evidente congestione delle meningi. Vista l'incertezza diagnostica si eseguivano campionamenti multipli per l'esame istopatologico. Istologicamente a livello del miocardio si evidenziavano edema diffuso e quadri di necrosi multifocale associati ad intensi infiltrati di granulociti neutrofilici, macrofagi ed, in minor misura linfociti. Nel polmone tutte le sezioni erano interessate da enfisema distruttivo, congestione ed emorragie perivasali o peribronchiali talora intense. A livello del SNC si riscontrava una lieve meningoencefalite e lesioni degenerative neuronali. Il quadro anatomopatologico complessivo era compatibile con cardioencefalite.

Dal materiale patologico inviato al laboratorio di virologia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER), veniva isolato Encefalomiocarditis Virus (EMCV). Le sezioni istologiche con quadri lesivi ritenuti significativi venivano sottoposte ad indagine immunoistochimica per la ricerca del virus (anticorpo monoclonale 3E5 – IZSLER). La reazione Ag-mAb, marcava intensamente il citoplasma delle fibre miocardiche e la distribuzione della positività era in accordo con la severità della lesione. La presente segnalazione, che si inserisce in un grave contesto epidemico insorto presso il giardino zoologico PNV, integra la carente bibliografia sulle lesioni da EMCV nei primati.

Parole chiave: Lemur catta, EMCV, encefalomiocardite, istopatologia, immunoistochimica

INTRODUZIONE

I lemuri sono un infraordine di primati del sottordine degli Strepsirrhini, essi vivono esclusivamente in Madagascar ed alcune piccole isole vicine. Sono inseriti nell'appendice I della "Convenzione sul commercio Internazionale delle specie di fauna e flora selvatica minacciate di estinzione" (CITES) e sulla Lista Rossa dell'Unione Internazionale per la Conservazione della Natura (IUCN). Presso il Parco Natura Viva di Bussolengo - Verona (PNV) sono ospitati 32 lemuri appartenenti a 6 specie differenti che costituiscono la più grande collezione italiana. Il PNV aderisce all'EAZA (European Association of Zoos and Aquaria) ed è coordinatore europeo EEP (European Endangered species Programme) per il *Lemur catta*.

SEGNALAMENTO E ANAMNESI

Il giorno 4 novembre 2006, presso il Parco Natura Viva di Bussolengo (PNV), un lemure dalla coda ad anelli

(*Lemur catta*), maschio, adulto (Arthur), di 1,7 kg, veniva trovato morto senza apparenti lesioni esteriori. Il keeper ed i veterinari del PNV non segnalavano alcuna anomalia comportamentale (individuale e di rapporto intraspecifico) e nessuna manifestazione di sofferenza nei giorni precedenti. In quel periodo si era registrato un sensibile incremento della popolazione di ratti che aveva reso necessario un intervento di derattizzazione.

SOSPETTO DIAGNOSTICO CLINICO-ANAMNOSTICO

Sulla base della rapida evoluzione temporale e dei rilievi soprascritti i veterinari del PNV consideravano in diagnosi differenziale alcuni eventi morbosi: avvelenamento da cumarinici (in relazione alla derattizzazione in atto), malattia setticemica acuta (evento da non escludersi in considerazione delle abitudini alimentari della specie), infarto ed encefalite virale. Al fine di ottenere delle indicazioni diagnostiche

si procedeva all'esame necroscopico ed a successivi esami di laboratorio.

ESAME MACROSCOPICO

All'apertura del torace si rilevava un discreto versamento lievemente emorragico. Nel pericardio si osservavano congestione ed emorragie perivasali che si estendevano al legamento sterno-pericardiaco. Il cuore appariva lievemente megalico ed in sezione, ad una attenta osservazione, si apprezzavano lievi aree biancastre soffuse. I polmoni apparivano diffusamente enfisematosi ed interessati da una fine tramatura congestizio-emorragica multifocale. Nella cavità addominale si rilevavano: ispessimento del peritoneo, lieve idroperitoneo, marcata congestione di tutti gli organi addominali particolarmente evidente a livello intestinale. Alcuni esili lacerti fibrosi connettevano la milza alla parete addominale. Il fegato, leggermente megalico, mostrava aspetti macroscopici di stasi. L'apertura longitudinale del tratto gastrointestinale permetteva di rilevare un essudato catarrale nel lume dell'intestino tenue e la presenza di cibo nello stomaco che ne dimostrava la recente assunzione. All'apertura della scatola cranica si notava una evidente congestione delle meningi. Vista l'incertezza diagnostica si eseguivano campionamenti multipli per il successivo l'esame istologico

ESAME ISTOLOGICO

Istologicamente le lesioni più evidenti si rilevavano a livello cardiaco. Nel pericardio si osservava congestione ed alcune rare emorragie interessavano la tonaca muscolare dei grossi vasi. Nel miocardio si notava marcata e diffusa linfangectasia ed edema interstiziale. La lesione dominante era la presenza di necrosi miocardica multifocale con aspetti degenerativi delle fibre muscolari (disgregazione) associate ad intensi infiltrati di granulociti neutrofili, macrofagi ed, in minor misura linfociti. Tali lesioni erano localizzate soprattutto nel setto interventricolare e alla base dei muscoli papillari settali. Nel polmone tutte le sezioni erano interessate da enfisema distruttivo, congestione ed emorragie perivasali o peribronchiali talora intense. Modesti infiltrati linfo-plasmacellulari si organizzavano in sede peribronchiale. A livello epatico si riscontrava notevole congestione centrolobulare associata a steatosi micro-macrovescicolare prevalentemente perilobulare (aspetto a noce moscata). Quadri congestizio emorragici si osservavano anche nei campioni di rene. Nelle sezioni di encefalo si apprezzavano: congestione delle meningi e della corteccia, emorragie perivasali limitate allo spazio di Virchow-Robin, satellitosi ed aspetti di sofferenza neuronale sfocianti talora in necrosi neuronale. Il quadro anatomopatologico complessivo appariva dominato da miocardite interstiziale non purulenta, ma

le lesioni cerebrali potevano suggerire una possibile cardioencefalite. Non si potevano comunque escludere in senso assoluto lesioni infartuali e conseguenti danni encefalici. Il carattere delle lesioni riscontrate evidenzia una evoluzione acuta o iperacuta della malattia. Al fine di chiarire l'eziologia dell'evento si suggeriva l'esame virologico per verificare una possibile miocardite virale (Coxsackievirus B4, Simian Immunodeficiency Virus – SIV, Encephalomyocarditis Virus – ECMV).

ESAME VIROLOGICO

Dal materiale patologico (cuore, polmoni ed encefalo) conferito presso il laboratorio di virologia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER), inoculato su monostrato cellulare di una linea di VERO (cellule renali di African green monkey), veniva identificato, tramite una metodica ELISA sandwich, EMCV.

ESAME IMMUNOISTOCHEMICO

Allo scopo di evidenziare il rapporto “agente eziologico – lesione”, le sezioni istologiche di cuore e cervello con quadri lesivi ritenuti significativi venivano sottoposte ad indagine immunocitochimica. La ricerca del virus veniva effettuata tramite l'utilizzo di anticorpo monoclonale 3E5 (prodotto dall'IZSLER verso EMCV del suino) e la reazione Ag-mAb veniva svelata con complesso streptoavidina-biotina e cromogeno “novared”. La reazione immunocitochimica marcava intensamente il citoplasma delle fibre miocardiche degenerate nell'ambito dei focolai infiltrativi. La distribuzione della positività era in accordo con la severità delle lesioni cardiache.

DISCUSSIONE

Il virus dell'encefalomyocardite (EMCV) è conosciuto come causa di malattia nel suino ed in un'ampia varietà di mammiferi perlopiù in cattività (vari ungulati, roditori selvatici e da laboratorio, primati e raramente carnivori e uccelli). In natura EMCV sembra particolarmente virulento nell'elefante africano (*Loxodonta africana*). Malgrado il frequente riscontro di sieropositività in professioni che hanno numerosi contatti con suidi (veterinari, allevatori, keeper e cacciatori), nell'uomo l'effetto patogeno di tale infezione sembra complessivamente molto modesto (Tesh, 1978, Kishimoto *et al.* 1985, Deutz *et al.* 1997, Deutz *et al.* 2003a, Deutz *et al.* 2003b). Tuttavia, non è da escludersi, che i protocolli terapeutici in caso di cardiopatia possano interferire sull'individuazione dell'agente patogeno.

Nell'ambito dei giardini zoologici sono segnalati focolai epidemici con elevata mortalità in Australia (Reddacliff *et al.*, 1997) e negli Stati Uniti (Wells *et al.*,

1989), ma esistono numerose segnalazioni di casi singoli o dove erano coinvolti pochi soggetti. In molti di questi eventi, i ratti ed i topi catturati nell'ambito delle strutture presentavano elevati tassi anticorpali verso EMCV (Cittino *et al.*, 1988; Wells *et al.*, 1989; Hubbard *et al.*, 1992; Gutter, 1993) e ad oggi si ritiene che essi siano gli ospiti naturali del virus e reservoir dell'infezione (Cittino, 1995).

La presente segnalazione si inserisce nell'ambito di un focolaio epidemico che, presso il PNV, ha portato alla morte di circa il 30% della collezione di lemuri (3 *Varecia variegata rubra*, 3 *Lemur catta*, 1 *Eulemur macaco macaco* e 2 *Eulemur albifrons*).

Nella bibliografia consultata si riscontrano alcune descrizioni anatomopatologiche delle lesioni determinate da tale virus nei primati (Krylova *et al.* 1977, Dzhikidze *et al.* 1981, Dzhikidze *et al.* 1982, Levin *et al.* 1986, Blanchard *et al.* 1987, Hubbard *et al.* 1992, Baskin, 1993, Krylova and Dzhikidze, 2005, Jones *et al.* 2005) ma le informazioni relative ai lemuri sono molto carenti (Reddacliff *et al.*, 1997).

CONCLUSIONE

La presente segnalazione si dimostra originale per la rarità delle descrizioni anatomopatologiche sugli effetti di EMCV nei lemuri reperibili in letteratura. Le informazioni raccolte insieme all'elevata letalità del focolaio a cui appartiene il caso segnalato, implicano importanti riflessi nella gestione della specie in cattività ed in natura.

RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano il prof. Giovanni Di Guardo, per la consulenza nell'interpretazione delle lesioni neurologiche individuate, la dott.ssa Alessandra-Luisa Amorena, per gli spunti diagnostici suggeriti e la dott.ssa Carla Calligaro, per l'esecuzione delle colorazioni istochimiche necessarie.

BIBLIOGRAFIA

Cittino S.B., Homer B.L., Gaskin J.H., Wickham D.J. 1988. Fatal encephalomyocarditis virus infection in a Sumatran orangutan (*Pongo pygmaeus abelii*). *J. Zoo. Wildl. Med.* 19(4):214-218.
Baskin GB. 1993. Encephalomyocarditis virus infection, nonhuman primates. Jones TC, et al. (eds). *Monographs on pathology of laboratory animals: Nonhuman primates I.* Springer-Verlag, 104-107.
Blanchard JL, Soike K, Baskin GB. 1987. Encephalomyocarditis virus infection in African green and squirrel monkeys: comparison of pathologic effects. *Lab Anim Sci.* 1987 Oct;37(5):635-9.
Deutz A., Fuchs K., Nowotny N., Schuller W. 1997. Serological examination on zoonoses in veterinarians. Part III: prevalence of antibodies to viral zoonoses and

prophylaxis. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift* 84 (8):211-219.

Deutz A., Fuchs K., Nowotny N., Auer H., Schuller W., Stünzner D., Aspöck H., Kerbl U., Köfer J. 2003a. Sero-epidemiological studies of zoonotic infections in hunters. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 115(3):61-67.

Deutz A., Fuchs K., Schuller W., Nowotny N., Auer H., Aspöck H., Stünzner D., Kerbl U., Klement C., Köfer J. 2003b. Sero-epidemiological studies of zoonotic infections in hunters in South-Eastern Austria - prevalences, risk factors, prophylaxis. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 116(7/8):306-311.

Dzhikidze E.K., Krylova, R.I. Shchevtsova, Z.V. Uvarova, V.I. Voskanyan, N.A. 1981. Spontaneous and experimental encephalomyocarditis in monkey. *Erkrankungen der Zootiere. Verhandlungsbericht des XXIII. Internationalen Symposiums über die Erkrankungen der Zootiere*, 24-28 Juni, in Halle/Saale, 1981, pp. 385-388.

Dzhikidze EK, Krylova RI, Balaeva EI, Chalian VG. 1982. Encephalomyocarditis in hamadryas baboons. *Vopr Virusol.* 27(4):418-22.

Gutter A.E. 1993. Encephalomyocarditis in zoo animals. In: Fowler, M.E. (ed.). *Zoo and Wild Animal Medicine*. 2nd Ed. W.B. Saunders Co., Philadelphia, pp. 50-51.

Hubbard G.B., Soike K.F., Butler T.M., Carey K.D., Davis H., Butcher W.I. Gauntt C.J. 1992. An encephalomyocarditis virus epizootic in a baboon colony. *Lab. Anim. Sci.* 42:233-239.

Jones P., Mahamba C. Rest J., André C. 2005. Fatal inflammatory heart disease in a bonobo (*Pan paniscus*). *Journal of Medical Primatology*, 34 (1): 45-49.

Kishimoto C, Tomioka N, Kawai C. 1985. Clinical findings in acute viral myocarditis. With special attention to experimental and immunological evidence. *Herz*. 10(1):15-20.

Krylova R.I., Balaeva E.I., Voskanyan N.A., Dzhikidze E.K., Shevtsova Z.V. 1977. Pathologic anatomy of experimental diseases of small laboratory animals caused by encephalomyocarditis virus (strain EMK-70). *Biull Eksp Biol Med.* 84(9):368-72.

Krylova R.I., Dzhikidze E.K. 2005. Encephalomyocarditis in Monkeys. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 139(3): 355-359.

Levin R. Yaari A. Gitelman J., Bino T., Rosenberg H., Kohn A. 1986. Pathogenesis of encephalomyocarditis (EMC) virus in baboon monkeys. *Israel Journal of Veterinary Medicine*. 42(1):41.

Reddacliff L.A., Kirkland P.D., Hartley W.J., Reece R. L. 1997. Encephalomyocarditis virus infections in an Australian zoo. *J Zoo Wildl Med.* 28(2):153-7.

Tesh RB. 1978. The prevalence of encephalomyocarditis virus neutralizing antibodies among various human populations. *Am J Trop Med Hyg.* Jan, 27(1 Pt 1):144-9.



Wells S.K., Gutter A.E., Soike K.F., Baskin G.B. 1989.
Encephalomyocarditis virus: epizootic in a zoological
collection. *J. Zoo Wildl. Med.* 20:291-296.

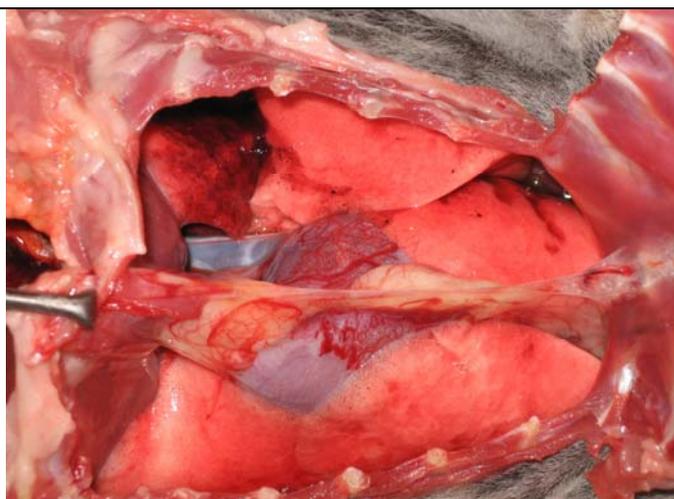


Figura 1. Apertura cavità toracica. Discreto versamento lievemente emorragico, congestione, rinforzo della trama vascolare ed emorragie perivasali nel pericardio e nel legamento sterno-pericardiaco.

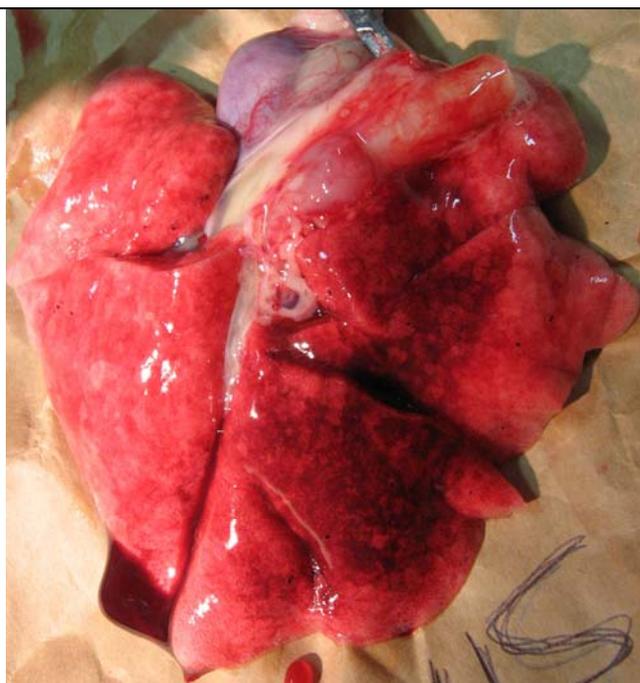


Figura 2. Polmoni diffusamente enfisematosi ed interessati da una fine tramatura congestizio-emorragica.



Figura 3. Apertura scatola cranica. Evidente congestione delle meningi.

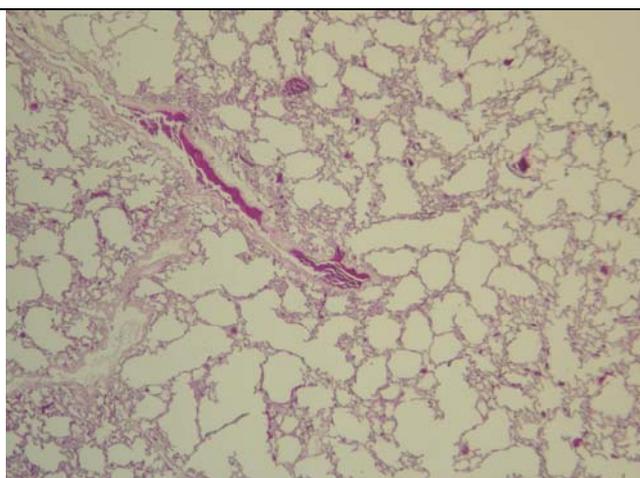


Figura 4. Immagine istologica panoramica di parenchima polmonare (col. EE). Aspetto diffusamente enfisematoso e lievemente congestizio-emorragico.

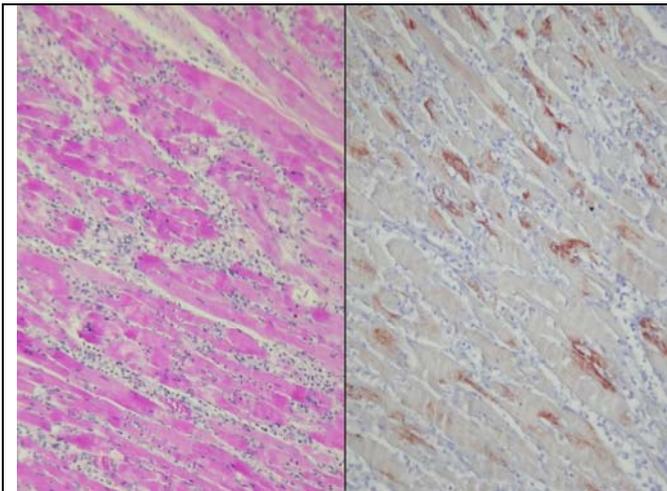


Figura 5. Miocardio. A sinistra: focolaio di infiltrazione di cellule infiammatorie associato a sofferenza delle fibre muscolari cardiache (col. EE). A destra: reazione immunocitochimica positiva nei confronti del citoplasma delle fibre miocardiche degenerate nell'ambito dei focolai infiltrativi.

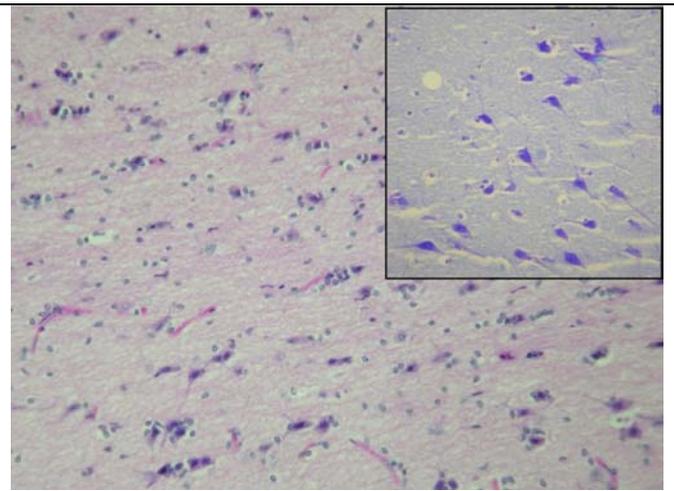


Figura 6. Cervello. Immagine istologica a medio ingrandimento (200X) di corteccia cerebrale (col. EE). Si osserva diffusa satellitosis ed aspetti di sofferenza neuronale sfocianti talora in necrosi neuronale. In alto a destra: alcuni neuroni evidenziati con la Colorazione Nissl (Cresyl violetto).

ANATOMOPATHOLOGICAL ASPECTS IN A FATAL ENCEPHALOMYOCARDITIS VIRUS (EMCV) INFECTION IN A *LEMUR CATT*A

In November 2006, in the Parco Natura Viva - Garda Zoological Park, Italy (PNV), a male adult ringtailed lemur (*Lemur catta*), of weight 1,7 kg, was found dead without apparent exterior lesions. In previous days no disease signs were noted from the PNV keeper and the veterinarians. The necropsy was performed to verify the main diagnostic suspicion of poisoning by rodenticide used to housing deratization. Thoracotomy revealed a moderate thoracic effusion slightly hemorrhagic; the heart shows congestion and perivascular hemorrhages of the pericardium, slight cardiomegaly and cutting heart revealed pale-whitish areas; the lungs were emphysematous and presented multifocal congestive-hemorrhagic condition. Moreover meninges congestion was also observed. Several samples were carried on for histopathological exams to verify the presuntive diagnosis. Histologically, myocardium was widely edematous, characterized by multifocal necrosis associated to strong neutrophils, macrophages and, lesser lymphocytes inflammatory infiltrates. All the lungs section presented destructive enfisema, congestion and perivascular or peribronchial hemorrhages. In the CNS it was observed slight meningoencephalitis and neuronal degenerative lesions. The anatomopathological pattern agreed with cardioencephalitis.

Encephalomyocarditis Virus (EMCV) was isolated from pathological tissues in Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER). Immunohistochemistry was performed on histological sections using the monoclonal antibody 3E5 (IZSLER). The Ag-mAb reaction, marked strongly myocardic fiber cytoplasm and the positivity distribution was correlated to the lesion severity. The present report was related to epidemic outbreak in PNV and it enriched the knowledge on the primates lesions due to EMCV.

Key words: Lemur catta, EMCV, Encephalomyocarditis, histopathology, immunohistochemistry

ULTERIORI POLIMORFISMI DEL GENE DELLA PROTEINA PRIONICA RIDUCONO SIGNIFICATIVAMENTE LA SUSCETTIBILITA' ALLA SCRAPIE DEGLI OVINI CON GENOTIPO ARQ/ARQ

¹Maestrale Caterina, ²Carta Antonello, ¹Attene Sonia, ²Sechi Stefania, ¹Galistu Adriana, ¹Santuoccu Cinzia, ¹Cancedda Giovanna Maria, ¹Saba Mariangela, ¹Patta Cristiana, ¹Bandino Ennio, ¹Demontis Franca, ¹Uras Patrizia, ¹Ciriaco Ligios

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna - Sassari

²Istituto Zootecnico Caseario della Sardegna – Olmedo

I polimorfismi ai codoni 136, 154 e 171 del gene della proteina prionica ovina sono gli unici comunemente ritenuti capaci di modulare la resistenza/suscettibilità alla scrapie, benché ne siano noti numerosi altri a codoni differenti. Nella pecora Sarda la malattia è correlata al genotipo ARQ/ARQ. Tuttavia, l'effetto di polimorfismi ad altri codoni non è stato ancora investigato.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di verificare la presenza di ulteriori polimorfismi del gene della proteina prionica nella razza Sarda e verificarne l'effetto sulla resistenza/suscettibilità alla malattia. In particolare sono state studiate le associazioni tra le mutazioni ai codoni 112, 137, 141, 142, 143, 154 e 176 in soggetti ARQ/ARQ e la resistenza/suscettibilità alla malattia. A tal fine è stato sequenziato l'intero gene della proteina prionica di 256 ovini affetti da scrapie e di 320 ovini sani provenienti da 24 focolai di malattia. Inoltre, 20 ovini con genotipo ARQ/ARQ, 2 dei quali con mutazioni puntiformi al codone 176 e 141 ed uno con una singola mutazione al codone 176, sono stati sperimentalmente infettati con la scrapie ed inclusi nello studio. L'analisi statistica dei risultati mediante regressione logistica ha dimostrato che i soggetti ARQ/ARQ portatori di ulteriori polimorfismi hanno un rischio significativamente minore di contrarre la scrapie. Tra i singoli polimorfismi, quelli ai codoni 137 e 176 conferiscono il maggior grado di resistenza alla malattia. Nella infezione sperimentale, i 3 ovini portatori dei polimorfismi ai codoni 176 e 141 sono rimasti sani, contrariamente ai 17 con genotipo ARQ/ARQ privo di ulteriori polimorfismi che si sono ammalati dopo un periodo medio di incubazione di circa 600 giorni.

Parole chiave: scrapie, ovini, mutazione, proteina prionica

ADDITIONAL POLYMORPHISMS OF THE *PRNP* GENE SIGNIFICANTLY DECREASE THE SUSCEPTIBILITY TO SCRAPIE OF ARQ/ARQ SHEEP

It is commonly considered that only three polymorphic codons, namely 136, 154 and 171 of the *PRNP* gene are of fundamental importance in moderating resistance/susceptibility to scrapie. As in other breeds, the wild type ARQ sequence of Sarda breed sheep, which is regarded as the most susceptible to scrapie, can contain additional polymorphisms at codons 112, 137, 141, 142, 143, 154 and 176. The association of these polymorphisms with scrapie is in most cases little known, if not unknown. The aim of this work was to investigate the risk of scrapie of the ARQ/ARQ genotype carrying at least one point mutation at codons 112, 137, 141, 142, 154 and 176 in comparison with the ARQ/ARQ without any point mutations. We carried out a study on 256 scrapie-affected sheep and 320 flock-mate negative controls belonging to 24 affected flocks. Twenty ARQ/ARQ experimentally scrapie-inoculated sheep, of which 2 had additional point mutations at codons 176 and 141 and 1 only one point mutation at codon 176, were also included in the study. Logistic regression analysis demonstrated that sheep carrying the ARQ allele with additional polymorphisms had lower risk of becoming sick. ARQ/ARQ genotypes that were detected with heterozygous or homozygous substitutions at codons 137 and 176 had the lowest risk of the disease. Interestingly, only the 3 experimentally ARQ/ARQ scrapie-inoculated sheep with additional polymorphisms did not develop the disease.

Key words: scrapie, sheep, mutation, prion protein

PRP^{Sc} NELLE GHIANDOLE SALIVARI DI PECORE AFFETTE DA SCRAPIE

Vascellari Marta¹, Nonno Romolo², Mutinelli Franco¹, Bigolaro Michela¹, Di Bari Michele Angelo², Melchiotti Erica¹, Marcon Stefano², D'Agostino Claudia², Vaccari Gabriele², Conte Michela², De Grossi Luigi³, Rosone Francesca³, Giordani Francesco³, Agrimi Umberto²

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Laboratorio Istopatologia, Viale dell'Università 10, 35020 Legnaro (PD)

²Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento Sicurezza Alimentare e Sanità Animale, Viale Regina Elena 299, 00161 Roma

³Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, Strada Terme, 01100 Viterbo

La Scrapie è una malattia neurodegenerativa e trasmissibile della pecora e della capra, appartenente al gruppo delle Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili (EST), o malattie da prioni. Studi epidemiologici e sperimentali hanno dimostrato che la scrapie si trasmette per via orizzontale da animale malato ad animale sano, sia tramite contatto diretto, sia attraverso la contaminazione dell'ambiente. Rimangono tuttavia da accertare quali siano le vie di eliminazione dei prioni da parte dell'animale infetto. Nel presente lavoro è stata condotta un'indagine per valutare la presenza di proteina prionica patologica (PrP^{Sc}) in ghiandole salivari di pecore infette da scrapie e di pecore sane. Le metodiche diagnostiche utilizzate sono state l'immunoistochimica (IHC), il Paraffin Embedded Tissue blot (PET blot) ed il Western blot (WB). La PrP^{Sc} è stata riscontrata nelle ghiandole salivari maggiori (parotide, ghiandola mandibolare) e minori (ghiandole buccali, labiali e palatine) di pecore infettate sia naturalmente sia sperimentalmente. L'immunoistochimica ha evidenziato la presenza di depositi di PrP^{Sc} intracellulari nell'epitelio duttale e ghiandolare ed occasionalmente è stata riscontrata positività nel lume dei dotti escretori. La concentrazione della PrP^{Sc} nelle ghiandole salivari è stata stimata pari allo 0,02-0,005% rispetto a quella presente nel tessuto nervoso mediante WB. La presenza di PrP^{Sc} nelle ghiandole salivari evidenzia il possibile ruolo svolto dalla saliva nella trasmissione orizzontale della scrapie.

Parole chiave: ghiandole salivari, immunoistochimica, PET-blot, PrP^{Sc}, scrapie

PRP^{Sc} IN SALIVARY GLANDS OF SCRAPIE-AFFECTED SHEEP

Scrapie of sheep and goats is a transmissible spongiform encephalopathy (TSE), or prion disease. Epidemiological and experimental studies suggest that the spread of scrapie among sheep mainly occurs by horizontal transmission, either by direct transmission or by prion shedding into the environment. The salivary glands of scrapie-affected sheep and healthy controls were investigated for the presence of the pathological prion protein (PrP^{Sc}), by tools of immunohistochemistry (IHC), Paraffin Embedded Tissue blot (PET blot) and Western blot (WB). PrP^{Sc} was detected in major (parotid and mandibular) and minor (buccal, labial and palatine) salivary glands of naturally and experimentally infected sheep. By western blot, PrP^{Sc} concentration in glands was estimated as 0.02-0.005% of brain. Immunohistochemistry revealed intracellular deposition of PrP^{Sc} in ductal and acinar epithelium and occasional labeling into the lumen of salivary ducts. The presence of PrP^{Sc} in salivary glands highlights the possible role of saliva in the horizontal transmission of scrapie.

Key words: salivary glands, immunohistochemistry, PET-blot, PrP^{Sc}, scrapie

CITOMORFOMETRIA NUCLEARE PER LA VALUTAZIONE DI MICROMETASTASI LINFONODALI IN CANI CON MASTOCITOMA CUTANEO: RISULTATI PRELIMINARI

Abramo Francesca¹, Marconato Laura², Francione Deborah³, Gregori Michela¹, Masserdotti Carlo⁴,
Leotta Roberto⁵, Marchetti Veronica⁶

**Dipartimento di ¹Patologia Animale, ⁵Produzioni Animali, ⁶Clinica Veterinaria - Università di Pisa; Libero professionista, ²Clinica "L'Arca"-Napoli, ³Pisa, ⁴Padova*

Il mastocitoma cutaneo canino (MCT) ha un comportamento biologico estremamente variabile. Il coinvolgimento del linfonodo sentinella (LS) è uno dei principali fattori prognostici, tuttavia le micrometastasi possono essere difficili da identificare. Scopo del lavoro era di i) valutare morfometricamente il numero di mastociti (MC) nei linfonodi di cani sani (n=4 Gruppo 1), con malattie infiammatorie o infettive (n=18, Gruppo2) e con MCT (n=40, Gruppo 3). Il gruppo 3 veniva ulteriormente suddiviso in sottogruppo 3A (assenza metastasi nel LS, stadio I), 3B (presenza certa di metastasi nel LS, stadio II-IV) e 3C (occasionale presenza nel LS di MC di difficile interpretazione); e ii) analizzare morfometricamente i parametri nucleari come elementi predittivi di micrometastasi, valutando il decorso clinico a supporto del comportamento biologico. Il numero di MC era espresso come percentuale (%) su 2000 cellule, l'analisi morfometrica nucleare era eseguita sui seguenti parametri: area nucleare media (ANM), lunghezza minore e maggiore del nucleo, fattore di forma nucleare (FF) e coefficiente di variazione dell'area nucleare. Le % medie del numero di MC nei gruppi 1, 2 erano di 0, e 0,01, mentre nei sottogruppi 3A, 3B e 3C rispettivamente di 0,07, 46,9 e 2,5% (p< 0.05). I valori di ANM erano statisticamente più elevati (713.94±16.0) nel sottogruppo 3B rispetto al gruppo 2 (419.9± 75,3) (p< 0.05). Nel gruppo 3C ANM era 700,85, suggerendo la presenza di MC neoplastici; tale ipotesi di malattia micrometastatica correlava con il follow-up (soggetti deceduti o con metastasi a distanza). I risultati preliminari dimostrano che la morfometria nucleare rappresenta un metodo valido per il rilievo di micrometastasi, rendendo possibile una corretta valutazione prognostica.

Parole chiave: mastocitoma, cane, linfonodo sentinella, micrometastasi

CYTO-MORPHOMETRICAL APPROACH FOR EVALUATING SENTINEL LYMPH NODE MICROMETASTATIC LOAD IN CANINE MAST CELL TUMORS: PRELIMINARY RESULTS

Canine cutaneous mast cell tumors (MCTs) have an extremely variable biologic behaviour. Sentinel lymph node (SLN) involvement is a relevant prognostic factor, however micrometastatic disease recognition is often challenging. The aims of the study were to i) evaluate morphometrically the number of MCs in the LNs of clinically healthy dogs (n=4, Group 1), with inflammatory diseases or infections (n=18, Group 2), and with cutaneous MCT (n=40, Group 3); Group 3 was further divided into Subgroup 3A (no SLN metastases - stage I), 3B (obvious LN metastasis - stage II-IV) and 3C (occasional MCs in SLNs, thereby being difficult to stage) and ii) analyze nuclear parameters as predictors of micrometastasis, using clinical outcome as criteria for tumor behaviour. MCs have been morphometrically evaluated for number (percentage on 2000 cells) and for the following nuclear parameters: mean nuclear area (MNA), largest to smallest diameter length, mean nuclear form factor (FF), and coefficient of variation of the nuclear area. The average % of MCs were 0.0 and 0.01 in Group 1 and 2, respectively, and 0.07, 46.9 and 2.5 in Subgroup 3A, 3B and 3C. MNA was significantly higher (713.94±16.0) in Subgroup 3B than in Group 2 (419.9± 75.3)) (p< 0.05). Of interest, MNA of Subgroup 3C was 700.85, suggesting the presence of neoplastic MCs; this prediction of micrometastatic load correlated with outcome (death or development of distant metastases). Analysis of the preliminary results of this prospective study show that nuclear morphometry is a useful tool to detect micrometastatic disease in the SLN of dogs bearing cutaneous MCTs

Key words: mast cell tumour, dog, sentinel lymph node, micrometastasis

MASTITE BOVINA DA *PROTHOTHECA ZOPFII*: OSSERVAZIONI ANATOMO-ISTOPATOLOGICHE

Amatiste Simonetta, Eleni Claudia, Grifoni Goffredo, Falchi Antonella, Rosati Remo

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana-Via Appia Nuova, 1411 - Roma

Nel corso di indagini batteriologiche condotte in un allevamento bovino da latte che presentava un elevato numero di cellule somatiche nel latte di massa, è stata isolata *Prothoteka zopfii*, un'alga unicellulare, priva di clorofilla.

Nelle bovine da latte *P. zopfii* causa una mastite a carattere cronico evolutivo recidivante. Inizialmente determina solo innalzamento delle cellule somatiche, nelle fasi successive, si possono manifestare segni clinici ad andamento cronico, limitati alla sola ghiandola mammaria, difficilmente differenziabili da mastiti di origine batterica. Il latte si può presentare acquoso con presenza di flocculazioni e coaguli di fibrina.

Sono state esaminate le mammelle ed i linfonodi sopramammari prelevati in sede di macellazione da due soggetti più volte risultati positivi all'esame microbiologico nei confronti di *P. zopfii*.

All'esame anatomopatologico, le mammelle mostravano aree di consistenza aumentata ed al taglio si osservava la presenza di formazioni ascessuali di pochi mm di diametro, disseminate nel parenchima. Era inoltre presente ispessimento della parete dei dotti e del canale del capezzolo. I linfonodi sopramammari si presentavano notevolmente aumentati di volume, senza distinzione fra corticale e midollare e con aree emorragiche diffuse.

Il quadro istopatologico, riconducibile ad una mastite cronica piogranulomatosa, era caratterizzato da infiltrati infiammatori interstiziali, costituiti da macrofagi, linfociti e plasmacellule e da proliferazione di tessuto fibroblastico, di entità variabile in relazione allo stadio di cronicizzazione. Nel lume alveolare erano presenti macrofagi inglobanti elementi algali nel citoplasma, neutrofili e cellule epiteliali sfaldate. Le alghe, presenti anche a livello interstiziale come forme singole o sporulanti, si coloravano debolmente con l'ematosilina-eosina, mentre venivano nettamente evidenziate con l'acido periodico-Schiff (PAS) e con la colorazione argento-metenamina secondo Gomori-Grocott (GMS) per i miceti. Nei linfonodi era presente una marcata linfoadenite iperplastica con presenza di numerosi neutrofili nei seni sottocapsulari e midollari; con la PAS e la GMS era possibile evidenziare anche alcuni elementi algali riconducibili a *P. zopfii*.

Parole chiave: bovino, mastite, *Prothoteka zopfii*, istopatologia

BOVINE MASTITIS CAUSED BY *PROTHOTHECA ZOPFII*: ANATOMO-HISTOPATHOLOGICAL FINDINGS

A colorless unicellular alga causing mastitis (*Prothoteka zopfii*) has been isolated during bacteriological investigation in a dairy herd, with high somatic cells count in bulk milk.

Two infected cows have been slaughtered and the udders and regional lymph nodes examined. The udders showed increased firmness areas and scattered microabscess were detected; enlarged lymph nodes without a clear distinction between cortical and medullar showed hemorrhagic lesions.

The mammary histopathological lesions were characterized by interstitial infiltrates of macrophages, lymphocytes, plasma cells and proliferation of fibroblastic tissue of varying degrees of severity. *P. zopfii*, slightly stained with haematoxylin-eosin and strongly stained with periodic acid-Schiff (PAS) and Grocott's methenamine silver (GMS) for fungi, was detected in alveolar lumen and in the interstitium, inside or outside macrophages. Severe hyperplastic lymphadenitis with numerous neutrophils and some *Prothoteka* organisms have been detected in lymph nodes.

Key words: bovine, mastitis, *Prothoteka zopfii*, histopathology

IL LIPOSARCOMA NEL CANE E NEL GATTO: STUDIO ISTOLOGICO ED IMMUNOISTOCHEMICO DI 31 CASI

Bacci Barbara, Bettini Giuliano, Bleeke Cristina

*Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria,
Università di Bologna*

I liposarcomi sono neoplasie descritte piuttosto raramente in tutte le specie animali domestiche, caratterizzati da elevata invasività locale, ma scarsa tendenza alla metastatizzazione. Scopo del presente studio è quello di definire le caratteristiche istologiche e immunoistochimiche del liposarcoma nel cane e nel gatto.

È stata condotta un'indagine retrospettiva su 31 casi diagnosticati come liposarcoma, asportati in 21 cani (13 maschi e 8 femmine, età media 9,6 anni) e 10 gatti (2 maschi e 8 femmine, età media 9,5 anni), localizzati a livello sottocutaneo in 26 casi e viscerale in 5 casi (3 nella milza e 2 nel grasso omentale). All'istologia i casi sono stati classificati come lipoma atipico (4 cani), liposarcoma ben differenziato (6 cani, 1 gatto), liposarcoma mixoide (4 cani, 1 gatto) e liposarcoma pleomorfo (7 cani, 8 gatti). I casi sono stati graduati secondo lo schema di grading istologico per i sarcomi dei tessuti molli, in liposarcomi di grado I (4 cani, 1 gatto), grado II (10 cani, 1 gatto), grado III (3 cani, 8 gatti), sulla base dell'attività mitotica, della differenziazione cellulare e della presenza di necrosi. Sono state effettuate indagini immunoistochimiche con i seguenti risultati: vimentina (31/31), S100 (8/31), actina (15/31), CD117 (2/31), CKAE1/3 (0/31). Per ogni caso è stato inoltre valutato l'indice di proliferazione (MIB-1 index), che è risultato significativamente correlato al grading istologico e all'istotipo; nel gatto l'attività proliferativa era inoltre significativamente superiore a quella rilevata nel cane ($P < 0,05$).

Parole chiave: liposarcoma, immunoistochimica, cane, gatto

LIPOSARCOMA IN DOGS AND CATS: HISTOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY OF 31 CASES

Liposarcoma is an uncommon neoplasm in domestic animals; it is locally invasive but rarely metastasizes. The aim of the present study is to define histological and immunohistochemical features of 31 cases of liposarcoma in 21 dogs (10 males, 8 females; mean age 9,6 years) and 10 cats (2 males, 8 females, mean age 9,6 years); 26 cases were subcutaneous and 5 cases visceral (3 spleen and 2 omental fat).

By histology, cases were classified as atypical lipoma (4 dogs), well differentiated liposarcoma (6 dogs, 1 cat), myxoid liposarcoma (4 dogs, 1 cat), pleomorphic liposarcoma (7 dogs, 8 cats). Cases were classified as grade I (4 dogs, 1 cat), grade II (10 dogs, 1 cat) and grade III (3 dogs, 8 cats), based on mitotic activity, cellular differentiation and necrosis. Immunohistochemistry was performed with the following results: vimentin (31/31), S100 (8/31), actin (15/31), CD117 (2/31), CKAE1/3 (0/31). Proliferative activity (MIB-1 index) was significantly related to the histological grade and to the histotype; furthermore MIB-1 index was significantly higher in cats than in dogs ($P < 0,05$).

Key words: liposarcoma, immunohistochemistry, dog, cat

ESPRESSIONE DI MARKER DI PROLIFERAZIONE E DETERMINAZIONE DEI GLICOSAMINOGLICANI NELLA RIPARAZIONE DEL TENDINE D'ACHILLE DEL RATTO

Bollo Enrico, Tursi Massimiliano, Gandini Marco, Bellino Claudio, Amedeo Stefano

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

Scopo del lavoro è stato la valutazione dell'efficacia dell'impiego di una miscela aminoacidica nella rigenerazione tendinea nel ratto. Sono stati utilizzati 12 ratti Wistar Sprague-Dawley maschi di 11 settimane, sottoposti a lesione chirurgica del tendine d'Achille e successivamente suddivisi in due gruppi: trattati (6 soggetti, somministrazione di miscela aminoacidica per via orale quotidianamente per 4 settimane) e controlli (6 soggetti). Al termine del periodo di trattamento i ratti sono stati soppressi ed è stato espantato il tendine d'Achille, fissato in formalina e colorato con ematossilina-eosina. Ulteriori sezioni sono state sottoposte a colorazione immunohistochimica con anticorpi anti-TGF-beta, anti-IGF-I e anti-PCNA. Da frammenti di tessuto sono stati inoltre estratti e separati i glicosaminoglicani (GAGs). L'esame istologico ha evidenziato una maggiore presenza di fibroblasti nel gruppo dei trattati, mentre i soggetti di controllo presentano una percentuale maggiore di macrofagi, tessuto di granulazione, tessuto fibroso, necrosi ed emorragie. Differenze significative si rilevano inoltre nell'espressione dei marker di proliferazione: IGF-I è maggiormente espresso nei trattati rispetto ai controlli ($P=0,008$), al contrario del PCNA ($P=0,011$). La quantità totale dei GAGs e l'acido ialuronico risultano maggiori nel gruppo di controllo; tuttavia dermatan-solfato, eparan-solfato e condroitin-solfato A sono risultati maggiori nel gruppo dei trattati. In conclusione il trattamento con miscele aminoacidiche di lesioni tendinee indotte sperimentalmente in un modello animale sembra determinare un miglioramento dell'evoluzione delle lesioni attraverso un anticipo della proliferazione di elementi cellulari responsabili della riparazione tissutale.

Parole chiave: ratto, tendine d'Achille, riparazione

EXPRESSION OF PROLIFERATION MARKERS AND EVALUATION OF GLICOSAMINOGLICANS IN ACHILLES TENDON HEALING IN A RAT MODEL

Aim of the investigation was the evaluation of the efficacy of a pharmaceutical aminoacid composition in Achilles tendon healing in the rat. Twelve male Wistar Sprague-Dawley rats aged 11 weeks underwent surgical transection of the Achilles tendon. Treated group (6 animals) was administered a pharmaceutical aminoacid composition per os for 4 weeks; 6 animals served as control. At the end of the treatment period, animals were euthanatized and the Achilles tendon was removed, formalin-fixed, and H&E stained. Further sections were immunohistochemically stained with anti-TGF-beta, anti-IGF-I and anti-PCNA antibodies. Furthermore glicosaminoglicans (GAGs) were extracted and determined from tissue fragments. Histological examination revealed a higher percentage of fibroblasts in treated animals, while controls showed a higher percentage of macrophages, granulation and fibrous tissue, necrosis and hemorrhages. Significant differences were revealed in the expression of proliferation markers: IGF-I was expressed in a higher percentage in treated than control animals ($P=0.008$), while PCNA scored higher in control than in treated animals ($P=0.011$). The total amounts of GAGs and hyaluronic acid were higher in the control group, although dermatan sulphate, heparan sulphate and chondroitin sulphate scored higher in treated animals. In conclusion the treatment of Achilles tendon surgical lesions with a pharmaceutical aminoacid composition in a rat model apparently induces a positive evolution of the lesions by anticipating the proliferation of cells responsible of the healing.

Key words: rat, Achilles tendon, healing

IL RUOLO DEL PAPILOMAVIRUS BOVINO TIPO 2 NEI TUMORI VASCOLARI DELLA VESCICA URINARIA DEL BOVINO

Borzacchiello Giuseppe, Russo Valeria, Balcos Liviu*, Spoleto Claudia, Rizzo Consuelo, Venuti Aldo**, Roperto Sante, Roperto Franco**

Dipartimento di Patologia e Sanità animale. Sez.ne Patologia generale ed Anatomia patologica - Facoltà di Medicina veterinaria “Federico II”

**Faculty of Agriculture – Jasi University – Jasi - Romania*

*** Laboratorio di Virologia – Istituto per lo studio e la cura dei Tumori “Regina Elena” - Roma*

Nel bovino, il tumore della vescica è una patologia comune in alcune aree geografiche dove cresce rigogliosa la felce (*Pteridium aquilinum*) ed è associato, clinicamente, all’ematuria enzootica cronica (EEC).

L’ematuria è il risultato di una cistite cronica, spesso emorragica, che evolve con la comparsa di tumori vescicali sia di origine epiteliale che mesenchimale.

Un ruolo importante nella patogenesi di questi tumori è svolto dall’azione sinergica tra sostanze flogogene ed oncogene contenute in questa varietà di felce e il papillomavirus bovino tipo 2 (BPV-2).

Precedenti lavori condotti da questo gruppo di ricerca hanno dimostrato non solo la presenza del DNA del BPV-2 nei tumori vescicali, ma anche l’espressione dell’ oncoproteina E5, la sua maggiore proteina trasformante, a conferma del ruolo svolto dal virus nel determinismo di questa neoplasia.

Mentre è noto il ruolo del BPV-2 e di E5 nella cancerogenesi uroteliale, scarsi sono gli studi riguardanti l’ oncogenesi dei tumori vascolari della vescica; così come non ci sono dati relativi all’ espressione dell’ oncoproteina E7 nei tumori mesenchimali.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare l’ espressione delle oncoproteine virali E5 ed E7 in 27 tumori vascolari della vescica urinaria di bovini.

I risultati ottenuti indicano la presenza del BPV-2 nel 100% dei tumori vascolari da noi esaminati ed inoltre mostrano la co-espressione delle oncoproteine E5 ed E7 solo nelle cellule endoteliali neoplastiche e non in quelle normali.

Questi risultati supportano e rafforzano il ruolo svolto dal BPV-2 e dalle sue oncoproteine E5 ed E7 anche nella cancerogenesi spontanea vascolare della vescica urinaria.

Parole chiave: BPV-2; felce; E5; E7; tumori vascolari

THE ROLE OF BOVINE PAPILOMAVIRUS TYPE-2 IN VASCULAR TUMOURS OF THE URINARY BLADDER IN CATTLE

In cattle, tumours of the urinary bladder are commonly associated with a syndrome known as Chronic Enzootic Haematuria (CEH) due to prolonged ingestion of bracken fern.

It has long been known that cattle, suffering from CEH, may develop bladder cancer of both epithelial and mesenchymal types. Previous studies have pointed out a strong relationship between Bovine papillomavirus type 2 (BPV-2) and bracken fern. DNA of BPV-2 was found in 69% of experimental bladder cancers and in 7 out of 15 naturally occurring ones. This high degree of association between bladder cancers and BPV-2 suggested that this virus could play a role in bladder oncogenesis.

While the role of the BPV-2 and of its major transforming oncoprotein (E5) has been established in the urothelial carcinogenesis, there are no information regarding tumours of mesenchymal origin. It’s known that BPV-2 E7 is not thought to have transforming properties by itself, but it can enhance the transforming activity of the E5 and E6. E5 and E7 were also found to be co-expressed in some tumour samples. The aim of this study is to evaluate the BPV-2 DNA and the expression of E5 and E7 oncoproteins in vascular tumours of the urinary bladder in cattle. We show that the BPV-2 is present in 100% of the vascular tumours of the urinary bladder examined. The viral oncoprotein are expressed only in neoplastic cells and not in normal endothelial cells, thus suggesting a role for this oncogene in naturally occurring vascular carcinogenesis. Our data provide evidence for a possible role of the BPV-2 in tumours of mesenchymal origin such those arising from endothelial cells in its natural host.

Key words: BPV-2; Bracken fern; E5; E7; vascular tumours

EFFETTI SULLA MORFOLOGIA DEL TIMO A SEGUITO DELLA SOMMINISTRAZIONE DI DESAMETAZONE A DOSI TERAPEUTICHE ED ANABOLIZZANTI NEL BOVINO

Cannizzo Francesca Tiziana, Miniscalco Barbara, Bollo Enrico, Guglielmino Roberta, Riondato Fulvio, Farinetti Paola, Biolatti Bartolomeo

*Dipartimento di Patologia Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli studi di Torino.
10095 Grugliasco (TO), Italia*

Il desametazone (DEX) è utilizzato nel bovino principalmente a scopo terapeutico, tuttavia viene spesso impiegato illegalmente a basse dosi come promotore di crescita. Nel presente lavoro è stata eseguita una somministrazione sperimentale di DEX in vitelli a carne bianca allo scopo di valutare gli effetti del trattamento a dosi anabolizzanti e terapeutiche sulla morfologia e sull'apoptosi nel timo. A tal fine sono stati utilizzati 32 vitelli suddivisi in tre gruppi: gruppo A (10 animali, inoculati con 5 mg di DEX-21-isonicotinato IM ai tempi T0 e T7); gruppo B (10 animali, inoculati con 0,4 mg/giorno di DEX-21-fosfato *per os* per 20 giorni); gruppo K (12 animali, utilizzati come controllo). Due animali di controllo sono stati macellati al tempo T0 e successivamente due animali di ciascun gruppo sono stati macellati ai tempi T3, T7, T14, T32, e T52. Il peso relativo del timo è risultato drasticamente ridotto nei gruppi A e B, rispettivamente del 74,5% e del 32,5% rispetto al gruppo K al T14. Al T30 il peso del timo è risultato ridotto del 21,2% nel gruppo A e del 53,3% nel gruppo B rispetto ai controlli. Dopo 32 giorni dall'ultima somministrazione il peso del timo degli animali dei gruppi A e B ritornava ad essere paragonabile a quello del gruppo K. L'indagine istologica ha rilevato una iniziale deplezione dei timociti e la successiva sostituzione con tessuto adiposo a seguito del trattamento terapeutico ed anabolizzante. L'apoptosi, valutata mediante ApopTag® *In Situ* Apoptosis Detection Kit e attraverso citofluorimetria a seguito di marcatura con ioduro propidio, ha evidenziato una correlazione tra atrofia e apoptosi dei timociti. Pertanto i risultati ottenuti evidenziano la capacità del desametazone anche a dosi anabolizzanti di indurre apoptosi e conseguentemente atrofia del timo. In conclusione, il presente studio indica che il peso e l'istologia del timo si confermano degli ottimi indicatori del trattamento fraudolento con corticosteroidi nei vitelli.

Parole chiave: desametazone, apoptosi, timo, bovino

EFFECTS OF ANABOLIC AND THERAPEUTIC DOSES OF DEXAMETHASONE ON THYMUS MORPHOLOGY AND APOPTOSIS

An experimental administration of dexamethasone (DEX) was carried out in veal calves in order to assess the role of anabolic and therapeutic dosages of DEX on thymus morphology and apoptosis. Thirty-two veal calves were included in this study: group A (10 animals) was administered 5 mg i.m. of DEX-21-isonicotinate at days 0 and 7; group B (10 animals) was administered 0.4 mg/day of DEX-21-phosphate *per os* for 20 days. Twelve animals served as control (group K). Two animals were slaughtered at T0, and two from each group at five different intervals (T3, T7, T14, T32, T52). The weight and size of the thymus was progressively reduced in both groups A and B. At T14 a reduction of 74.5% and 32.5% in thymus weight of the group A and B respectively was observed. At T30 the thymus weight was reduced to 21.2% in group A while was 53.3% in group B compared to control. At T32 the thymus weight of treated animals returned similar to that of controls. *In situ* and flow cytometric examination of apoptosis revealed a clear correlation of atrophy with apoptosis of thymocytes. The findings suggest that dexamethasone induce apoptosis and consequent thymus atrophy; these lesions appear to be reversible, allowing the thymus gland to return to his original weight and structure in few weeks after the last administration of the drug.

Key words: dexamethasone, apoptosis, thymus, bovine

BLASTOMA POLMONARE DEL BOVINO

Carminato Antonio, Bozzato Elisa, Trevisan Laura, Vascellari Marta, Catania Salvatore, *De Palma Domenico, Mutinelli Franco

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Laboratorio Istopatologia, Viale dell'Università 10,
35020 Legnaro (PD)*

**Servizio Veterinario, ASL 15, Cittadella (PD)*

Viene descritto un caso di blastoma polmonare in una bovina di razza Frisona italiana di 13 anni. All'esame necroscopico si è rilevata la presenza di noduli multipli biancastri ben circoscritti, disseminati nel polmone, di aspetto lardaceo e cistico in sezione, che interessano anche pleura e linfonodi. Istologicamente, i noduli neoplastici sono risultati costituiti da cellule epiteliali e cellule mesenchimali. Le cellule epiteliali davano origine a nidi, tubuli e formazioni simili ai bronchioli del polmone normale. Le cellule di origine mesenchimale erano di forma fusata con nuclei ovali e citoplasma eosinofilo, oppure rotondeggianti e multinucleate con citoplasma granulare eosinofilo, o ancora blastiformi con grandi nuclei ipercromatici e citoplasma anfofilo. L'aspetto microscopico del tumore variava notevolmente da un'area all'altra. Le cellule epiteliali hanno reagito positivamente nei confronti delle citocheratine. Alcune cellule mesenchimali presentavano una differenziazione di tipo muscolare dimostrando immunoreattività nei confronti della vimentina e della actina muscolo-specifica; le cellule mesenchimali rotondeggianti multinucleate non esprimevano invece differenziazione in senso muscolare. La diversa espressione dei filamenti intermedi nell'ambito della neoplasia è indicativa della presenza di diverse vie di differenziazione cellulare nel blastoma polmonare.

Parole chiave: blastoma, bovino, immunohistochimica, polmone

A CASE OF BOVINE PULMONARY BLASTOMA

A case of pulmonary blastoma in a 13-year-old Italian Frisian cow is reported. On postmortem, the gross lesions were those of multiple whitish circumscribed masses throughout the lungs, with pleural involvement and lymph node metastasis. Histologically, the tumour was composed of a dual population of mesenchymal and epithelial neoplastic cells. Epithelial cells formed nests, tubules, and structures resembling bronchioles of normal lung. Mesenchymal cells were spindle shaped with oval nuclei and fibrillar eosinophilic cytoplasm, large rounded cells with multiple round nuclei and granular eosinophilic cytoplasm, or blast-like, with large hyperchromatic nuclei and amphophilic cytoplasm. The tumour varied greatly in appearance from one field to another within the same tumour. Epithelial cells stained positively with antibodies developed against cytokeratin. Some spindle-shaped mesenchymal cells exhibited smooth muscle cell differentiation with positive staining with anti-vimentin and anti-muscle-specific actin antibodies; rounded mesenchymal cells with multiple nuclei did not express muscle cell differentiation. The variable expression of the intermediate filaments indicates multiple pathways of differentiation in the pulmonary blastoma.

Key words: blastoma, dairy cow, immunohistochemistry, lung

LIPOLEIOMIOMA VAGINALE IN UN CANE

Carminato Antonio, Bozzato Elisa, Vascellari Marta, Mutinelli Franco

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Laboratorio Istopatologia, Viale dell'Università 10,
35020 Legnaro (PD)*

Viene descritto un tumore vaginale in un cane Pastore Tedesco di 8 anni. La neoplasia si presentava di consistenza fibrosa, di colore bianco e delle dimensioni di 10x4 cm. Istologicamente, si è osservata una crescita espansiva, non capsulata e costituita da lobuli di tessuto adiposo maturo associati a fasci di cellule muscolari lisce ben differenziate. All'esame immunohistochimico, le cellule neoplastiche presentavano un'intensa reazione positiva nei confronti della α -actina muscolo liscio e della desmina; nessuna immunoreazione si osservata invece nei confronti di citocheratine e vimentina. Le cellule neoplastiche sono risultate inoltre negative nei confronti dei recettori per estrogeni. Sulla base dei riscontri macroscopici, istologici ed immunohistochimica è stata formulata una diagnosi di lipoleiomioma.

Parole chiave: apparato genitale femminile, cane, immunohistochimica, lipoleiomioma

CANINE VAGINAL LIPOLEIOMYOMA

A vaginal tumour from an 8-year-old female German Shepherd dog was surgically excised and investigated histologically. The tumour appeared firm, white, and measured 10x4 cm. On histology, the mass showed an expansive growth, was nonencapsulated and composed of lobules of mature adipocytes admixed with streams and bundles of well-differentiated smooth muscle cells. Immunohistochemically, the neoplastic cells had strong diffuse cytoplasmic positivity for α -smooth muscle actin and desmin, and no immunoreactivity for cytokeratin or vimentin. The neoplastic cells were also negative to oestrogen receptors. A diagnosis of lipoleiomyoma was made according to gross, microscopic and immunohistochemical findings.

Key words: dog, female genital system, immunohistochemistry, lipoleiomyoma

STUDI SULLA ESPRESSIONE LOCALE E SISTEMICA DELLA PROTEINA DI FASE ACUTA α 1-GLICOPROTEINA ACIDA IN CORSO DI ARTRITE INDOTTA DA CAEV

Fabrizio Cecilian, Cristina Lecchi, Sara Piccinelli, Arianna Pagani, Mizanur Rahman, Marina Maccalli, Giuliano Pisoni, Alba Miranda-Ribera, Paola Sartorelli

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

La proteina di fase acuta α 1-glicoproteina acida (AGP) è una lipocalina con attività immunomodulatoria. AGP è una proteina fortemente glicosilata, ed il suo pattern oligosaccaridico può venire modificato in corso di patologie infiammatorie. Il virus della encefalite della capra (CAEV) è in grado di provocare una patologia a lenta insorgenza e progressione a carico del sistema nervoso centrale, delle articolazioni e della mammella. Le patologie articolari sono considerate degli ottimi modelli per studiare le modificazioni post-traduzionali delle proteine. In questo lavoro abbiamo voluto quindi studiare il comportamento della AGP di capra (gAGP) in corso di artrite indotta da CAEV. Il primo obiettivo dello studio è stato quello di valutare se la concentrazione ematica di gAGP viene modificata. In una seconda parte del lavoro sono state studiate le modificazioni post-traduzionali della gAGP, con lo scopo di evidenziare eventuali modificazioni del pattern oligosaccaridico correlate alla presenza della artrite. Come ultimo punto, è stata studiata mediante PCR quantitativa (Real Time PCR) la espressione della gAGP a livello della superficie articolare utilizzando come modello in vitro colture cellulari di sinoviociti infettate mediante CAEV. In questa comunicazione vengono presentati i risultati preliminari di questa ricerca. In una prima fase la gAGP serica è stata purificata ed è stata determinata la sua struttura primaria mediante sequenziamento del cDNA. Quindi si è proceduto ad analizzare la concentrazione di gAGP serica su 20 capre affette da artrite sostenuta da CAEV, e si è evidenziato come la concentrazione della proteina non sia aumentata rispetto agli animali sani utilizzati come controllo. In una fase successiva sono stati analizzati i pattern oligosaccaridici delle proteine purificate da animali patologici e da animali sani, e si è evidenziato che le proteine purificate da animali con artrite presentano un livello di ramificazione più elevato rispetto ai controlli sani. Inoltre, i residui di acido sialico sulla superficie della proteina appaiono aumentati.

Parole chiave: AGP, CAEV, Fase acuta, Capra, Glicosilazione.

INTRODUZIONE

La proteina di fase acuta α 1-glicoproteina acida (AGP) è una lipocalina con attività immunomodulatoria (1). AGP è una proteina fortemente glicosilata, ed il suo pattern oligosaccaridico può venire modificato in corso di patologie infiammatorie (2). Allo stato attuale non è presente nessuna informazione per quello che riguarda la AGP di capra. Dal momento che le patologie infiammatorie rappresentano un ottimo modello patologico per quello che riguarda sia la espressione sistemica delle proteine in corso di infiammazione che per quello che riguarda la produzione di proteine modificate a livello post-traduzionale, abbiamo voluto eseguire uno studio per quello che riguarda la espressione e la presenza di glicoforme patologiche in corso di una patologia infiammatoria sistemica della capra, la artrite indotta da CAEV. Il virus della encefalite della capra (CAEV) è in grado di provocare una patologia a lenta insorgenza e progressione a carico del sistema nervoso centrale, delle articolazioni e della mammella. In questo lavoro abbiamo voluto quindi studiare il comportamento della AGP di capra (gAGP) in corso di artrite indotta da CAEV. Lo studio si è articolato in tre punti:

1. Il primo obiettivo dello studio è stato quello di valutare se la concentrazione ematica di gAGP viene modificata.
2. In una seconda parte del lavoro sono state studiate le modificazioni post-traduzionali della gAGP, con lo scopo di evidenziare eventuali modificazioni del pattern oligosaccaridico correlate alla presenza della artrite.
3. Come ultimo punto, è stata studiata mediante PCR quantitativa (Real Time PCR) la espressione della gAGP a livello della superficie articolare utilizzando come modello in vitro cellule GSM (Goat Synovial Membrane) infettate mediante CAEV.

In questa comunicazione vengono presentati i risultati preliminari di questa ricerca.

MATERIALE E METODI

Il primo passaggio, indispensabile per poter caratterizzare le modificazioni post-traduzionali di gAGP in corso di CAEV, è costituito dalla purificazione della proteina alla omogeneità, ottenuta mediante tre passaggi cromatografici illustrati nella Fig 1. La omogeneità delle frazioni cromatografiche e la presenza della proteina è stata verificata mediante colorazione con Blue Coomassie e Western Blotting ed immunocolorazione utilizzando l'anticorpo policlonale anti bovine AGP messo a punto in un lavoro

precedente. Questa procedura ha permesso di purificare la gAGP a partire da 4 capre sane, che hanno costituito i controlli non patologici di questo esperimento, e da 7 animali con artrite indotta da CAEV. In una fase successiva è stata ottenuta la sequenza da cDNA della gAGP. Il pattern oligosaccaridico della gAGP è stato caratterizzato mediante Western Blotting e colorazione delle membrane con due lectine specifiche la ConA, che è in grado di individuare il livello di branching dal momento che reagisce con minore intensità con i carboidrati pluriramificati, e la SNAI, che invece reagisce con residui di acido sialico legati in posizione α (2-6) al galattosio. L'intensità delle bande corrispondenti alle singole AGP purificate è stata poi valutata densitometricamente ed espressa in densità ottica (O.D.).

La concentrazione ematica di gAGP è stata valutata mediante Radial Immuno Diffusion test, utilizzando come standard aliquote di gAGP purificata.

La espressione di gAGP nei sinoviociti è stata monitorata attraverso un modello comunemente utilizzato in questi studi, le cellule GSM infettate con virus CAEV. La espressione della gAGP è stata valutata attraverso Real Time-PCR.

RISULTATI

- La espressione sistemica di gAGP non viene modificata da CAEV

I risultati sono illustrati nella Figura 2, dove appare evidente che la concentrazione serica di gAGP in animali con artrite non aumenta, anzi sembra diminuire, rispetto a quella di animali sani utilizzati come controllo. In ogni caso, le differenze non sono risultate statisticamente significative.

- I livelli di glicosilazione di gAGP vengono modificati in corso di CAEV

Il grado di sialilazione e di ramificazione della gAGP è risultato essere molto simile fra animali controllo (non patologici) (Figura 3). Quindi i sieri degli animali non patologici sono stati uniti in un pool ed utilizzati come standard di controllo non patologico (np). Nella Figura 4 vengono invece illustrati i risultati della analisi del pattern di glicosilazione di gAGP purificate da capre affette da artrite CAEV-indotta. In particolare, vengono presentati i tracciati elettroforetici che riguardano il livello di sialilazione e di ramificazione degli animali patologici rispetto al controllo non patologico np. La Figura 5 illustra il risultato della analisi densitometrica delle bande colorate con le lectine. I risultati ottenuti dimostrano che il pattern di glicosilazione di gAGP viene modificato in corso di artrite CAEV-indotta. In

particolare, risulta aumentato sia il livello di sialilazione che quello di ramificazione.

- La espressione locale di gAGP aumenta dopo infezione con CAEV

Come illustrato nella Figura 6, la infezione sperimentale di colture di cellule GSM ha evidenziato che un aumento della carica infettante induce un aumento della espressione di mRNA codificante per gAGP. Da notare inoltre che il gene della gAGP appare espresso anche in condizioni non patologiche, e che ad una carica massima non corrisponde una equivalente espressione del gene.

E' possibile che la ridotta produzione di mRNA sia dovuta ad un aumento della apoptosi delle cellule GSM causata dall'azione di alte concentrazioni di virus.

DISCUSSIONE

In questa comunicazione preliminare è stato riportato uno studio sulla espressione sistemica e locale della proteina di fase acuta α 1-glicoproteina acida in corso di CAEV. E' stato utilizzato come modello sperimentale un gruppo di animali che presentavano un quadro clinico indicativo della forma artrite indotta da CAEV. I nostri dati hanno dimostrato che la concentrazione di gAGP non aumenta in corso di artrite indotta da CAEV. Possiamo quindi concludere che, dal punto di vista clinico, la AGP non può essere considerata una proteina di fase acuta per quello che riguarda la patologia scelta come modello. Abbiamo però evidenziato che la artrite causata da CAEV induce una serie di modificazioni del pattern oligosaccaridico. Questi due risultati non sono in contraddizione, dal momento che le vie metaboliche alla base della sovraespressione epatica delle proteine di fase acuta delle loro modificazioni post-traduzionali sono regolate da un diverso pattern di citochine [3]. L'approccio sperimentale utilizzato in questo lavoro ha permesso di evidenziare che nel torrente circolatorio di animali con CAEV sono presenti meno glicoforme che contengono oligosaccaridi di-antennari. Nel contempo, appare aumentata l'espressione di acido sialico legato in posizione α (2-6) al galattosio sulla superficie della AGP. I nostri risultati corrispondono parzialmente a quanto già riportato in medicina umana in corso di artrite reumatoide. Anche in questo caso si ha infatti un aumento delle glicoforme più ramificate. Nell'uomo è stato riscontrato un aumento del livello di fucosilazione, cosa che invece non è stato evidenziato dalla nostra analisi sulla AGP di capra. L'aggiunta dei residui di fucosio sulla catena oligosaccaridica è catalizzata dalla α 3-fucosyltrasferase, un enzima che

non è presente in tutte le specie. Nel topo per esempio non viene espresso [4]. E' quindi possibile che questo enzima non sia presente anche nella capra. Un aumento di acido sialico sulla superficie della proteina è caratteristico di patologie infiammatorie croniche ma non è stato ancora riportato in corso di artrite nell'uomo.

In questo lavoro abbiamo inoltre evidenziato che la gAGP può venire espressa a livello locale, ed aumenta in corso di infezione in vitro con CAEV. In medicina umana è stato suggerito che la AGP presente a livello articolare sia principalmente di origine epatica [5]. I nostri dati dimostrano invece che, anche se in misura probabilmente ridotta, è presente anche una componente locale di AGP. La presenza di gAGP a livello articolare risulta essere particolarmente interessante, dal momento che AGP è in grado di ridurre l'attività della collagenasi-3 nell'uomo [6], agendo quindi da proteina antinfiammatoria in grado di ridurre i danni a livello articolare.

CONCLUSIONI

I risultati preliminari di questo lavoro hanno evidenziato come la gAGP non aumenta di concentrazione in corso di CAEV, benché cambi sicuramente il suo pattern oligosaccaridico. Al contrario di quanto dimostrato in medicina umana però, i sinoviociti di capra esprimono costitutivamente AGP: questo risultato aprirebbe interessanti prospettive di sviluppo del lavoro per quello che riguarda il contributo della AGP allo sviluppo dello stato infiammatorio locale.

BIBLIOGRAFIA

1. Hocheplid T, Berger FG, Baumann H, Libert C. Cytokine Growth Factor Rev. 2003 14(1):25-34.
2. Cecilian F, Pocacqua V. Curr. Protein Pept. Sci. 2007 8(1):91-108.
3. Pos O, van der Stelt ME, Wolbink GJ, Nijsten MW, van der Tempel GL, van Dijk W. Clin. Exp. Immunol. 1990 82(3):579-82.
4. Havenaar EC, Hoff RC, van den Eijnden DH, van Dijk W. Glycoconj. J. 1998 15(4):389-95.
5. Havenaar EC, Dolhain RJ, Turner GA, Goodarzi MT, van Ommen EC, Breedveld FC, van Dijk W. Glycoconj. J. 1997 14(4):457-65.
6. Haston JL, FitzGerald O, Kane D, Smith KD. Biomed. Chromatogr. 2003 17(6):361-4.

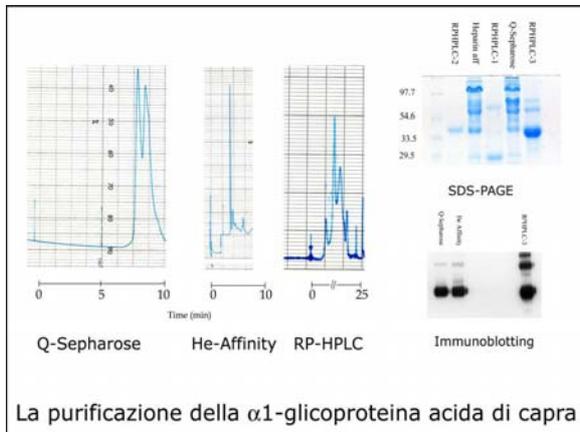


Figura 1

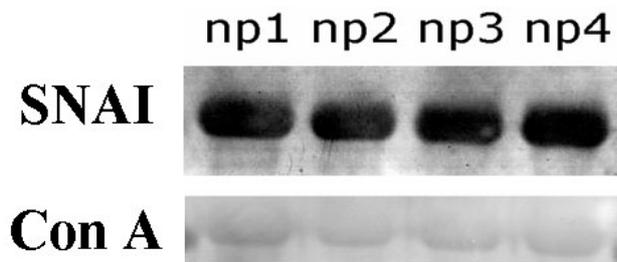


Figura 3
Animali non patologici

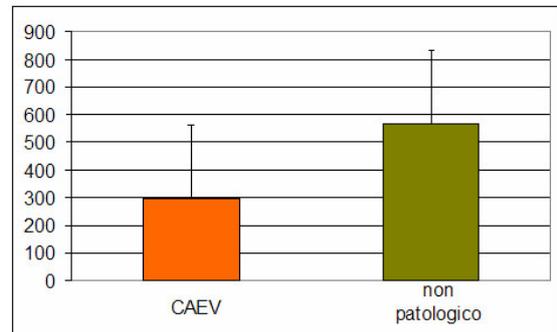


Figura 2

Concentrazione ematica di gAGP

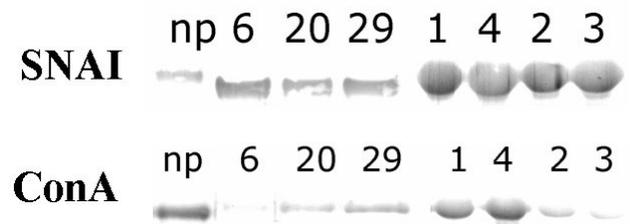
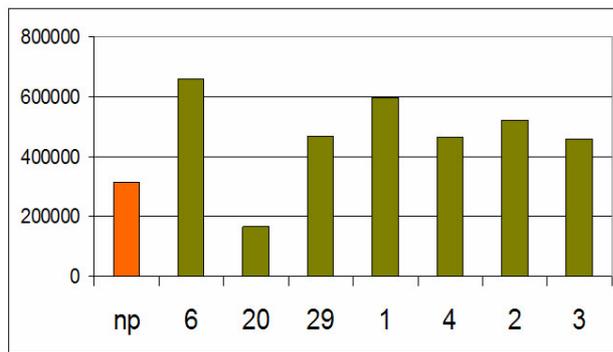
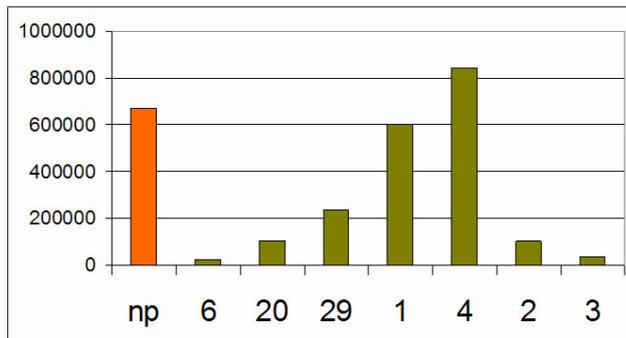


Figura 4

Sialilazione (SNAI) e ramificazione (ConA) di animali con artrite CAEV- indotta



SNAI



ConA

Figura 5

Risultati dell'analisi densitometrica

I risultati evidenziano, con la eccezione del campione 20, che la gAGP purificata da animali con artrite presenta un incremento del livello di sialilazione (Fig 4A).

Anche il livello di ramificazione appare aumentato, con la eccezione dell'animale 4 (Fig 4B)

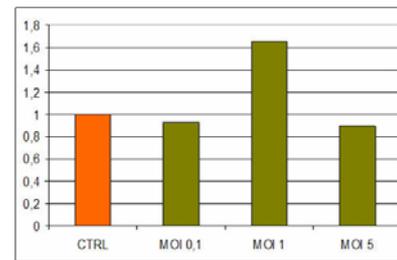


Figura 6

Espressione di gAGP in sinviocitiinfettati sperimentalmente
MOI = Multiplicity of Infection, ovvero
Numero Dosi infettanti (TCID50)/ numero di cellule

LOCAL AND SYSTEMIC EXPRESSION OF α_1 -ACID GLYCOPROTEIN DURING ARTHRITIS INDUCED BY CAEV INFECTION

Alpha1-acid glycoprotein (AGP) is an acute phase protein that can modulate the inflammatory reaction. One of the most interesting features of this protein is that its glycosylation microheterogeneity can be modified during inflammatory diseases. Caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) is an ungulate lentivirus that causes severe, progressive central nervous system disorders, arthritis, mastitis and eventually death of infected animals.

The present study was focussed on the behaviour of goat AGP (gAGP) during CAEV infection. In particular this short communication presents:

- the determination of gAGP concentration in blood during CAEV infection
- the analysis of the post-translational modifications of gAGP purified from CAEV infected animal.
- an in vitro study using GSM cells to ascertain by RT (Real Time) PCR the local expression of gAGP.

We found that serum gAGP concentration did not increase during the disease. Yet, the prolonged systemic inflammatory status caused by CAEV-arthritis apparently induced a modification of the carbohydrate moiety, in particular for what concerns the branching degree and its sialylation.

Key words: AGP, CAEV, Acute Phase Reaction, Goat, Glycosylation.

VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE IMMUNOCITOCHIMICA DI CD117 IN PREPARATI CITOLOGICI DA MASTOCITOMA

Cesari Alessandro⁽¹⁾, Marconato Laura⁽²⁾, Capitani Ombretta⁽³⁾, Bettini Giuliano⁽¹⁾

⁽¹⁾Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, ⁽³⁾Dipartimento Clinico Veterinario, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Bologna

⁽²⁾Clinica Veterinaria "L'Arca", Napoli

Il recettore CD117 (KIT o Stem Cell Factor Receptor) è una proteina transmembrana ad attività tirosin-chinasica normalmente presente nelle cellule germinali, nelle cellule mieloidi immature e nei mastociti. Nei mastociti è possibile verificare con l'immunoistochimica l'esclusiva localizzazione di CD117 a livello di membrana citoplasmatica; nel mastocitoma del cane e del gatto l'espressione di CD117 è mantenuta, ma spesso delocalizzata, con comparsa di intensa positività a livello intracitoplasmatico e paranucleare. Diversi studi hanno correlato la localizzazione di tale espressione (membrana citoplasmatica, citoplasma, paranucleare) al grado istologico e al comportamento biologico del mastocitoma, evidenziando la frequente associazione fra internalizzazione del recettore, minor differenziazione e comportamento più aggressivo. Inoltre, la localizzazione citoplasmatica del segnale immunoistochimico può indicare mutazioni attivanti del proto-oncogene c-kit, a suggerire una potenziale efficacia del trattamento con farmaci antitirosinchinasici.

Poiché la diagnosi di mastocitoma nel cane e nel gatto è generalmente raggiunta con ottima specificità tramite la citologia agoaspirativa, si è voluto verificare se l'applicazione di metodiche immunocitochimiche per il CD117 a preparati citologici normalmente allestiti poteva fornire le stesse indicazioni dell'immunoistochimica, quanto ad intensità e localizzazione della positività.

Nei casi testati è stato possibile verificare un'ottima corrispondenza fra i risultati delle due tecniche. È stato inoltre verificato che strisci post-fissati in acetone mantengono una soddisfacente immunoreattività per circa 10 settimane, mentre non è stato possibile recuperare la reattività nei preparati precedentemente colorati con May Grünwald – Giemsa.

Parole chiave: mastocitoma, CD117, c-kit, citologia, immunocitochimica.

INTRODUZIONE

Il mastocitoma (MCT) è una delle neoplasie cutanee più comuni del cane, in cui rappresenta il 7-21% di tutte le neoplasie cutanee. Il comportamento biologico del mastocitoma è molto variabile; mentre alcuni sono tendenzialmente benigni e trattabili con successo con la sola chirurgia, altri mostrano crescita rapida e tendenza a dare metastasi. Sono stati fatti vari tentativi al fine di predirne il comportamento usando criteri come lo stadio clinico, l'indice di proliferazione e grado istologico. Quest'ultimo sembrerebbe essere il parametro predittivo più efficace e si basa principalmente sul sistema proposto da Patnaik, dove la valutazione della morfologia nucleare e la differenziazione delle cellule neoplastiche hanno un ruolo primario (5).

Il *c-kit* è un proto-oncogene che codifica per un recettore transmembrana di 14,5 kD (KIT o CD117, o Stem Cell Factor Receptor) che appartiene alla classe III della famiglia dei recettori ad attività tirosin-chinasica. Il ligando per il KIT è lo Stem Cell Factor (SCF), anche conosciuto come fattore di crescita dei mastociti. Il KIT svolge un ruolo fondamentale durante lo sviluppo fetale, fase in cui risulta espresso in molti tessuti; negli adulti l'espressione è invece mantenuta solo in un ristretto sottogruppo di cellule (cellule staminali emopoietiche, mastociti, linfociti intraepiteliali, cellule germinali, melanociti e cellule interstiziali di Cajal), in cui svolge ruoli di regolazione della differenziazione e della proliferazione cellulare (2).

In medicina umana è stata documentata la presenza di mutazioni di *c-kit* e conseguenti anomalie del recettore KIT in varie patologie dei mastociti come l'orticaria pigmentosa, la mastocitosi aggressiva e la leucemia mastocitaria, oltre che nei tumori stromali del tratto gastrointestinale (GISTs). Anche nel MCT canino sono state documentate varie anomalie di *c-kit* (mutazioni puntiformi, delezioni e duplicazioni), ed in vari casi di MCT ed è stato possibile correlarle ad una più spiccata aggressività da parte della neoplasia, in quanto potenziali responsabili dell'attivazione costitutiva del recettore KIT indipendente dall'interazione con il ligando, e quindi implicate nello sviluppo e nella progressione del tumore (7-8).

Il recettore KIT (CD117) è facilmente dimostrabile nei preparati istologici tramite immunocitochimica (IIC) (2); in particolare nei mastociti normali è apprezzabile una netta positività di membrana, che esprime la fisiologica localizzazione transmembrana del recettore, mentre nei mastociti neoplastici l'espressione del KIT può essere delocalizzata a livello citoplasmatico e paranucleare e alcuni studi hanno correlato questa

espressione aberrante al grado istologico (il pattern citoplasmatico diffuso è più frequente nei mastocitomi di grado I, mentre quello paranucleare nei mastocitomi di grado III) (5), alla prognosi (la presenza del KIT in sedi anomale sarebbe associata a una prognosi meno favorevole) (5-8), a mutazioni di *c-kit* (7-8) e alla potenziale efficacia del trattamento con farmaci antitirosinchinasici (1).

Considerata la potenziale utilità di una valutazione precoce dell'espressione del recettore KIT su preparati citologici ottenuti tramite agoaspirazione, che nella realtà clinica costituiscono il mezzo con cui è raggiunta con ottima sensibilità e specificità la diagnosi di MCT, in questo studio si è voluto verificare se l'applicazione di metodiche immunocitochimiche (ICC) per il CD117 a preparati citologici normalmente allestiti poteva fornire le stesse indicazioni dell'IIC, quanto ad intensità e localizzazione della positività.

MATERIALI E METODI

Lo studio ha riguardato casi di MCT canino diagnosticati citologicamente e in seguito rimossi chirurgicamente raccolti in un periodo di 6 mesi (novembre 2006 – aprile 2007). I campioni citologici sono stati ottenuti per agoaspirazione, strisciati su un vetro portaoggetti e lasciati asciugare all'aria; gli strisci per la valutazione citomorfologica sono stati colorati con May-Grünwald – Giemsa, mentre quelli destinati all'ICC sono stati fissati per 10 minuti in acetone raffreddato a 4°C. I campioni per l'istologia, derivanti dalla rimozione chirurgica del MCT, sono stati fissati in formalina al 10% tamponata a pH 7,2, inclusi in paraffina, sezionati a 4 µm e colorati con ematossilina eosina e blu di toluidina.

Immunocitochimica. Gli strisci non sottoposti immediatamente all'indagine ICC sono stati conservati a 4°C per un periodo variabile da pochi giorni a 10 settimane. Sui campioni fissati in acetone si procedeva a inibizione delle perossidasi endogene (perossido di idrogeno al 3% in metanolo per 10'), reidratazione (tampone TRIS per 10') e incubazione in camera umida con anticorpo policlonale di coniglio anti-CD117 umano (Dako; Dakopatts, Glostrup, Denmark) diluito 1:100 in PBS e 1% di BSA overnight a 4°C. Si procedeva poi a lavaggio (TRIS per 2'), incubazione con anticorpo secondario (IgG anti-rabbit biotinilato per 15'), ulteriore lavaggio in TRIS per 2', incubazione in streptoavidina-perossidasi (15'), lavaggio in TRIS per 2' e rivelazione in diaminobenzidina 0,04% per 10'. Dopo ulteriori lavaggi in TRIS (2') e in acqua distillata (2') si procedeva a colorazione di contrasto con May-Grünwald – Giemsa modificato (soluzione

May-Grünwald 1' e 20", lavaggio in acqua distillata 1', soluzione Giemsa diluita 1 goccia/cc per 5') e montaggio in DPX.

Immunoistochimica. Ulteriori sezioni istologiche sono state deparaffinate (2 bagni in Solvent Plus per 15') e reidratate in alcoli a concentrazione decrescente (3' ogni bagno). Si procedeva poi a inibizione delle perossidasi endogene (perossido di idrogeno al 3% in metanolo per 30'), riesposizione antigenica (2 cicli di 5' in forno a microonde a 750 Watt in tampone citrato pH 6 e raffreddamento a temperatura ambiente per 20'), incubazione in camera umida con anticorpo policlonale di coniglio anti-CD117 umano (Dako; Dakopatts, Glostrup, Denmark) diluito 1:100 in PBS e 1% di BSA overnight a 4°C. Dopo due lavaggi (TRIS per 5') si procedeva a incubazione con anticorpo secondario (IgG anti-rabbit biotinilato per 15'); seguivano due lavaggi (TRIS per 5'), incubazione in streptoavidina-perossidasi (15'), due lavaggi (TRIS per 5') e rivelazione in diaminobenzidina 0,04% per 10'. Dopo un ultimo lavaggio in TRIS (5') ed uno in acqua distillata (5') i preparati erano contrastati con ematossilina di Papanicolau e montati in DPX.

Valutazione della immunopositività. Nei preparati citologici e istologici la positività alla immunocolorazione per CD117 è stata valutata nei mastociti neoplastici in termini di localizzazione del segnale (M: membrana citoplasmatica; C: citoplasma; P: paranucleare) e di intensità dello stesso (+++: Intensa; ++: Moderata; +: Debole; -: assente).

RISULTATI

Lo studio ha riguardato 10 casi di MCT canino. In tutti i casi le procedure ICC e IIC hanno fornito un riscontro positivo; in tutti i 10 casi la positività IIC era evidente da moderata a intensa anche nel citoplasma, con marcati addensamenti nucleari in 3 casi. In tabella 1 sono presentati, caso per caso, i riscontri delle valutazioni ICC e IIC, che dimostrano un'ottima concordanza fra i due metodi, sia per intensità che per localizzazione dell'espressione del KIT.

Negli strisci sottoposti a ICC per KIT la morfologia cellulare si è mantenuta soddisfacente, a patto che gli strisci fossero correttamente allestiti (cellule integre in monostrato); in particolare gli ammassi multicellulari sono spesso risultati parzialmente negativi per insufficiente penetrazione dell'anticorpo; inoltre, se l'allestimento aveva provocato la rottura di numerose cellule si realizzava un fondo di intensa positività conseguente alla dispersione dell'antigene. Nella

valutazione dei preparati ICC l'utilizzo del May-Grünwald – Giemsa come colorante di contrasto (opportunamente modificato per ottenere una colorazione più tenue) ha permesso di distinguere più agevolmente gli elementi cellulari e di mantenere la metacromasia dei granuli dei mastociti.

E' stato inoltre apprezzato che gli strisci post-fissati in acetone hanno mantenuto una soddisfacente immunoreattività per circa 10 settimane se conservati a 4°C, e per circa 4 settimane se conservati a temperatura ambiente, mentre il tentativo di recuperare per l'ICC strisci già colorati con May-Grünwald – Giemsa (l'inibizione delle perossidasi determina la decolorazione degli strisci colorati) non ha avuto esito positivo.

Tabella 1.

Caso N°	Positività Immuno-Istochimica	Positività Immuno-Citochimica
Cane 1	C+++ P+++	C+++ P+++
Cane 2	C+++ P+++	C+++ P+++
Cane 3	M++ C+	M++ C+
Cane 4	C+	C+
Cane 5	M++ C+	M+
Cane 6	M++ C+	M++ C+++
Cane 7	C+++	C+++
Cane 8	M++ C+ P++	M+++
Cane 9	C+++	C+++
Cane 10	C++	C++

M=membrana citoplasmatica; C=citoplasma;

P=paranucleare

+++=Intensa; ++=Moderata; +=Debole

DISCUSSIONE

Il comportamento biologico del MCT nel cane è stato correlato in vari studi a grado istologico, differenziazione, quantità di AgNOR e stadio clinico (5) e attività proliferativa (8). Recentemente è stato evidenziato che il recettore KIT è spesso sovraespresso nei MCT, con comparsa di positività anche a livello di citoplasma e zone paranucleari (5) e che tali espressioni alterate sembrano avere importanza anche ai fini prognostici, in quanto collegate, anche se non in modo univoco, ad un comportamento più aggressivo (4-8). È stato inoltre rilevato che la comparsa di intensa positività citoplasmatica è correlata a mutazioni attivanti del proto-oncogene *c-kit* (7-8), il che fa considerare tali casi come candidati ottimali per la terapia a bersaglio molecolare con farmaci inibitori delle tirosin-chinasi (1).

Nei casi testati è stato possibile verificare un'ottima corrispondenza fra ICC e IIC, che hanno mostrato risultati quasi completamente sovrapponibili. La rivelazione del grado di espressione del KIT su preparati citologici potrebbe pertanto permettere di ottenere in tempi rapidi utili informazioni prognostiche su campioni prelevati in modo non invasivo già prima della chirurgia o in fase di stadiazione, permettendo così di impostare precocemente i più adeguati interventi terapeutici. Nei casi in cui la sola chirurgia non può essere risolutiva (recidive, diffusione metastatica, forme viscerali) potrebbe dare inoltre utili indicazioni sull'opportunità del trattamento con farmaci antitirosinchinasici.

with c-KIT and Its Role in Prognostication. *Veterinary Pathology* 44 p 298–308

BIBLIOGRAFIA

1. London C. A., Hannah A. L., Zadovoskaya R., Chien M. B., Kollias-Baker C., Rosenberg M., Downing S., Post G., Boucher J., Shenoy N., Mendel D. B., McMahon G. and Cherrington J. M. (2003): Phase I Dose-Escalating Study of SU11654, a Small Molecule Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor, in Dogs with Spontaneous Malignancies. *Clinical Cancer Research* 9 p 2755-2768
2. Morini M., Bettini G., Preziosi R., and Mandrioli L. (2004): C-kit Gene Product (CD117) Immunoreactivity in Canine and Feline Paraffin Sections. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 52(5) p 705–708
3. Murphy S., Sparkes A. H., Smith K. C., Blunden A. S., Brearley M. J. (2004): Relationships between the histological grade of cutaneous mast cell tumours in dogs, their survival and the efficacy of surgical resection. *Veterinary Record* 154 p 743-746
4. Newman S. J., Mrkonjich L., Walker K. K., Rohrbach B. W. (2007): Canine Subcutaneous Mast Cell Tumour: Diagnosis and Prognosis. *Journal of Comparative Pathology* 136 p 231-239
5. Preziosi R., Morini M., Sarli G. (2004): Expression of the KIT protein (CD117) in primary cutaneous mast cell tumors of the dog. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 16 p 554–561
6. Romansik E. M., Reilly C. M., Kass P. H., Moore P. F., London C. A. (2007): Mitotic Index Is Predictive for Survival for Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. *Veterinary Pathology* 44 p 335–341
7. Webster J. D., Kiupel M. and Yuzbasiyan-Gurkan V. (2006): Evaluation of the kinase domain of c-KIT in canine cutaneous mast cell tumors. *BMC Cancer* 2006, 6:85
8. Webster J. D., Yuzbasiyan-Gurkan V., Miller R. A., Kaneene J. B., Kiupel M. (2007): Cellular Proliferation in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors: Associations

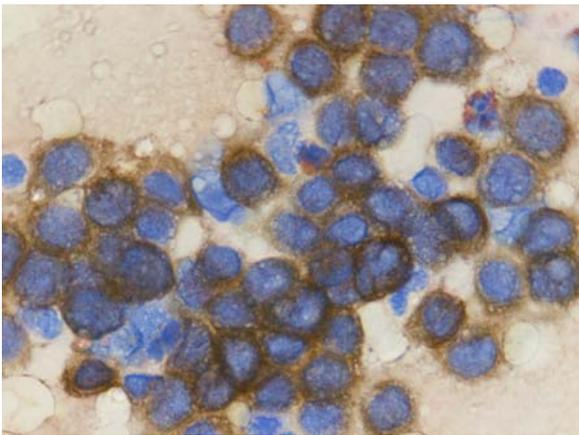


Figura 1. Cane, mastocitoma. Colorazione ICC per CD117 in un preparato citologico. Intensa positività citoplasmatica.

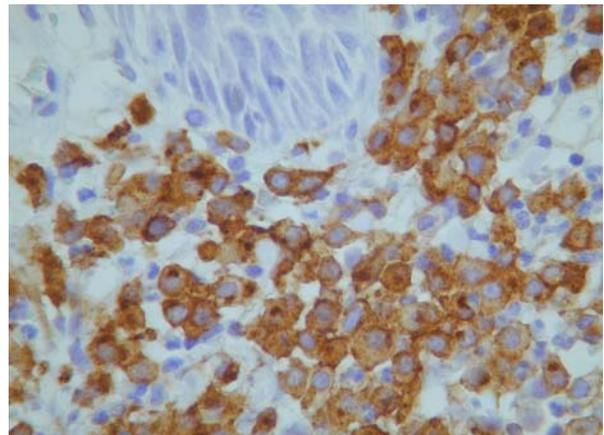


Figura 2. Cane, mastocitoma. Colorazione IIC per CD117 in un preparato istologico. Intensa positività citoplasmatica.

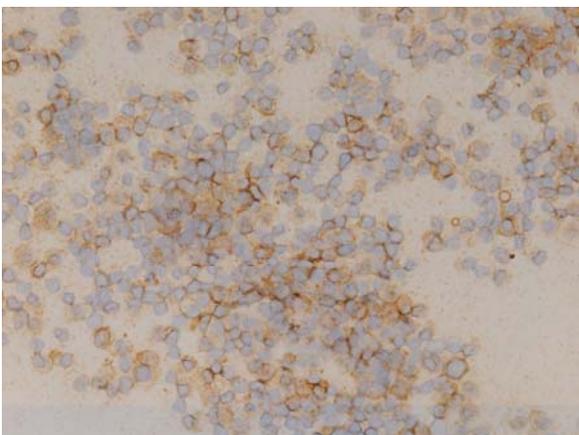


Figura 3. Cane, mastocitoma. Colorazione ICC per CD117 in un preparato citologico. Espressione prevalentemente di membrana.

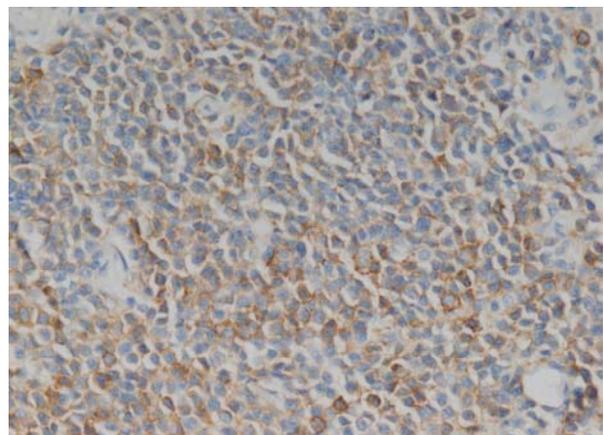


Figura 4. Cane, mastocitoma. Colorazione IIC per CD117 in un preparato istologico. Espressione prevalentemente di membrana.

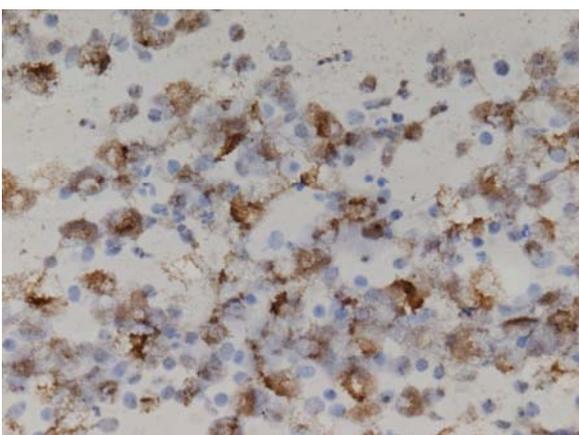


Figura 5. Cane, mastocitoma. Colorazione ICC per CD117 in un preparato citologico. Debole positività citoplasmatica con addensamenti paranucleari.

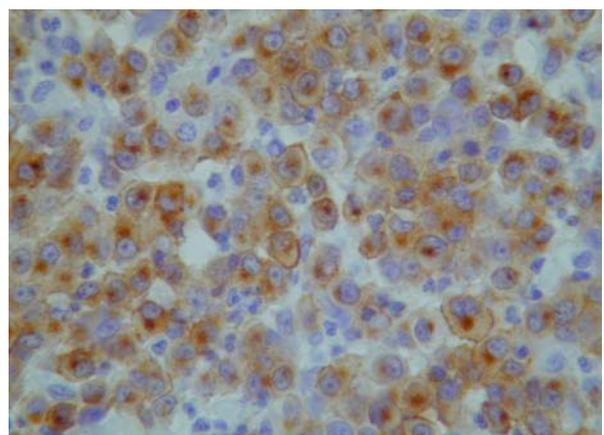


Figura 6. Cane, mastocitoma. Colorazione IIC per CD117 in un preparato istologico. Debole positività citoplasmatica con addensamenti paranucleari.

IMMUNOCYTOCHEMICAL EVALUATION OF CD117 EXPRESSION IN CYTOLOGIC SAMPLES OF MAST CELL TUMOR

The receptor CD117 (KIT o Stem Cell Factor Receptor) is a transmembrane tyrosine kinase protein normally present in germ cells, immature myeloid cells and mast cells. Immunohistochemistry reveals in mast cells its exclusive membranous localization, while in canine and feline mast cell tumor CD117 expression, although maintained, is often strongly evident also in the cytoplasm, especially as a paranuclear labelling. Several studies have correlated in canine mast cell tumors the location of KIT expression (membrane, cytoplasm, paranuclear) to histologic grading and biologic behaviour, and have verified a frequent association between its internal expression, poor differentiation and aggressive behaviour. Moreover, the cytoplasm labelling can indicate activating mutations of the *c-kit* proto-oncogene, suggesting a potential efficacy of the treatment with anti-tyrosinase drugs.

Since the diagnosis of mast cell tumor is generally achieved with great specificity by fine needle aspiration cytology, we tried to verify if the application of CD117 immunocytochemistry to cytologic samples could give the same information of immunohistochemistry, as for intensity and location of the positivity. In the tested cases, a good correspondence between the two techniques was verified. It was also observed that acetone fixed cytologic smears preserved their immunoreactivity for about 10 weeks, whereas it was not possible to retrieve the reactivity in the smears previously stained with May Grünwald – Giemsa.

Key words: mast cell tumor, CD117, c-kit, cytology, immunocytochemistry.

MICROLITIASI TESTICOLARE ASSOCIATA A TUMORI DELLE CELLULE GERMINALI IN UN CANE

Mario Cinone¹, Marielda Cataldi², Francesca Carella⁵, Giulio Aiudi³, Roberta Di Terlizzi⁴, Gionata De Vico⁵

¹ *Dipartimento di Scienze Animali, Vegetali e dell'Ambiente, Facoltà di Agraria, Università degli Studi del Molise, Campobasso (CB)*

² *Dip. Di Scienze Mediche veterinarie, Università di Messina;*

³ *Dipartimento di Produzione Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bari, Valenzano (BA);*

⁴ *Department of Veterinary Pathology, College of Veterinary Medicine, Iowa State University, Ames, USA;*

⁵ *Dipartimento delle Scienze Biologiche, Università di Napoli "Federico II", via Mezzocannone, 8 – 80134, Napoli*

La Microlitiasi testicolare (MT) è una rara patologia caratterizzata da fenomeni degenerativi della linea seminale con micro-calcificazione dei tubuli seminiferi e reazione fibrotica accerchiante. La MT è spesso associata, nell'uomo, a svariate altre lesioni testicolari, tra le quali si annoverano condizioni neoplastiche, quali il Seminoma e il cosiddetto "carcinoma *in situ*". Quest'ultimo si presenta tipicamente con un quadro istologico caratterizzato dalla presenza nei tubuli seminiferi di grandi cellule germinali atipiche con citoplasma chiaro spesso abbondante e nucleo vescicoloso con uno o più nucleoli, allineate lungo la membrana basale e a contatto con essa a formare spesso un monostrato. Tali cellule "spingono" in alto i nuclei delle cellule del Sertoli che sembrano anch'essi caratteristicamente allineati a circoscrivere i "gonociti" atipici all'interno dei tubuli seminiferi. In questo studio riportiamo gli aspetti clinici, istopatologici ed immunoistochimici di un peculiare caso di microlitiasi in un testicolo di Siberian Husky di 5 anni, nel cui controlaterale atrofico (ritenuto in addome) si diagnosticava un seminoma associato appunto a "carcinoma *in situ*". Dalla bibliografia consultata l'associazione tra queste lesioni, già descritta nell'uomo, non sembra essere stata riportata in precedenza nel cane, e conferma che tale specie può essere un ottimo modello per lo studio delle lesioni testicolari in patologia comparata.

TESTICULAR MICROLITHIASIS AND GERM CELLS TUMOURS IN CANINE TESTICLES: A CASE REPORT

Testicular microlithiasis (TM) is a rare human pathologic condition characterized by calcifications within the seminiferous tubules, originating from degenerative intratubular cellular debris that becomes surrounded by concentric layers of stratified collagen fibers. TM has been associated with a wide variety of testicular pathologies, including primary testicular seminoma (TS) and intratubular germ cell neoplasia (ITGCN) or "carcinoma *in situ*" (CIS). We report herein the clinical, histopathological and immunohistochemical findings in a case of TM detected in a Siberian Husky dog (5 yrs old, 27 bw) canine testicle whose controlateral cryptorchid testis developed a early seminoma associated with a Carcinoma *in situ* (CIS)-like pattern. To our knowledge, the association of TM, TS and CIS has never been reported in dogs so far. The present paper further support the opinion that dogs could be a very interesting animal model for human testicular disease.

VALUTAZIONE DI METODICHE AUTOMATIZZATE PER LA DETERMINAZIONE DEI PARAMETRI EMATOLOGICI IN ORATA (*Sparus aurata*)

Comazzi Stefano*, Volpatti Donatella§, Pertica Giulia*, Contessi Barbara§, Bulfon Chiara§,

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

§ Dipartimento di Scienze Animali, Sezione di Biologia e Patologia Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Udine

L'ematologia dei pesci è in genere complicata dalla presenza di eritrociti nucleati che non consente l'uso di contaglobuli automatici, non in grado di distinguere le cellule eritroidi dai trombociti e dai leucociti. Tecniche manuali di conta (camera di Neubauer), risultano laboriose e risentono di forte imprecisione e scarsa ripetibilità. La stima su vetrino del rapporto tra le varie cellule, non consente di trarre indicazioni sul numero totale delle stesse. Lavori recenti hanno suggerito l'utilizzo di metodiche citofluorimetriche per la valutazione delle cellule ematiche dei pesci mediante l'utilizzo di un colorante lipofilo fluorescente, il DiOC6, che si lega selettivamente a leucociti e trombociti, ma tale tecnica non è mai stata applicata a specie marine. Scopo del presente lavoro è valutare l'utilizzo di tecniche automatizzate combinate che rendano più agevole la determinazione dei parametri ematologici dell'orata. 26 campioni di sangue sono stati posti in provette con EDTA. Il numero di cellule totali (eritrociti+trombociti+leucociti) è stato valutato sul canale RBC di un contaglobuli ad impedenza. Il valore ematocrito è stato comparato con il microematocrito manuale. In citofluorimetria è stata valutata la percentuale di cellule DiOC6 positive e tra queste sono state identificate tre popolazioni cellulari, in base alle proprietà di scatter. La stima del rapporto tra eritrociti e leucociti+trombociti (E/TL) è stata valutata su striscio di sangue utilizzando un analizzatore d'immagine ed è stata eseguita una conta leucocitaria manuale su 100 cellule. Per ogni parametro sono stati valutati l'imprecisione (test di ripetibilità) e l'accuratezza (test di diluizione seriale). Le tecniche utilizzate si sono rivelate rapide in confronto con le tecniche manuali. La determinazione automatizzata del numero di cellule, dell'MCV e della concentrazione di emoglobina risulta caratterizzata da buona accuratezza e bassa imprecisione. L'ematocrito si è rilevato correlabile tra le due metodiche mentre non si sono evidenziate correlazioni tra la percentuale di cellule DiOC6 positive e il rapporto E/TL, né tra le popolazioni leucocitarie identificate in citofluorimetria e la formula manuale. Le tecniche utilizzate, nonostante non forniscano dati sovrapponibili a quelli ottenuti in manuale, sono utili per la valutazione delle cellule ematiche nell'orata in quanto più rapide e ripetibili. L'assenza di concordanza tra i risultati ottenuti con le diverse tecniche suggerisce la necessità di associare più metodiche e determinare i corretti valori di riferimento per l'orata.

Parole chiave: ematologia, orata, citofluorimetria.

INTRODUZIONE

L'ematologia dei pesci è in genere complicata dalla presenza di eritrociti nucleati che non consente l'uso di contaglobuli automatici, in quanto non in grado di distinguere le cellule eritroidi dai trombociti e dai leucociti. Tecniche manuali di conta (camera di Neubauer), risultano laboriose e risentono di forte imprecisione e scarsa ripetibilità (1). La stima su vetrino del rapporto tra le varie cellule, non consente di trarre indicazioni sul numero totale delle stesse. Lavori recenti (2) hanno suggerito l'utilizzo di metodiche citofluorimetriche per la valutazione delle cellule ematiche dei pesci mediante l'utilizzo di un colorante lipofilo fluorescente, il DiOC6, che si lega selettivamente a leucociti e trombociti, ma tale tecnica non è mai stata applicata a specie marine.

Scopo del presente lavoro è valutare l'utilizzo di tecniche automatizzate combinate che rendano più agevole la determinazione dei parametri ematologici dell'orata

MATERIALE E METODI

Ventisei campioni di sangue di orata sono stati posti in provette contenenti EDTA. Su campione refrigerato sono stati valutati, entro 24 ore dal prelievo:

Il numero di cellule nucleate (E) (eritrociti + trombociti + leucociti) mediante contaglobuli ad impedenza (SEAC, H8) utilizzando il canale per gli eritrociti.

Il valore ematocrito: mediante microematocrito manuale (PCV) e conta automatizzata (HCT). La conta di trombociti + leucociti (TL): calcolata valutando il rapporto (TL/E) su striscio di sangue (May Grünwald-Giemsa) su 20 campi microscopici mediante analizzatore d'immagine.

La formula leucocitaria manuale su striscio colorato con May Grünwald-Giemsa

La percentuale di cellule DiOC6 positive (indicative di trombociti + leucociti): dopo colorazione con DiOC6 (0.01 g/ml sg) e valutazione citofluorimetrica (FACScan BD).

In accordo con quanto segnalato in letteratura (2) sono state identificate tre popolazioni cellulari DiOC6-positive in base alle proprietà di scatter (denominate con A= linfociti+ trombociti, B monociti, C granulociti) (figura 1)

Per ogni parametro sono stati valutati l'imprecisione (test di ripetibilità) e l'accuratezza (test di diluizione seriale) (3).

RISULTATI E DISCUSSIONE

I risultati degli esami ematologici sono descritti in tabella 1. Le prove di ripetibilità hanno mostrato valori di imprecisione esposti in tabella 2. Le prove di diluizione hanno evidenziato elevata accuratezza ($r^2 > 0,99$) sia per le conte di eritrociti che per l'ematocrito mentre valori inferiori sono stati ottenuti per quanto riguarda la percentuale di cellule DiOC6 positive ($r^2 > 0,80$).

Le metodiche utilizzate hanno evidenziato valori accettabili di imprecisione analitica (bassi valori di CV) rispetto alle metodiche manuali normalmente utilizzate (conta in camera di Neubaer). Inoltre consentono una più rapida esecuzione dei test (circa 10-15 minuti a campione) e possono essere applicate anche a campioni refrigerati per 24 ore in quanto la presenza di eventuali cellule rotte non porta a sovrastima della conta leucocitaria. Le prove di accuratezza (linearità) hanno evidenziato come i parametri più solidi risultino essere la conta di cellule totali, il microematocrito, l'HCT, il rapporto TL/ E mentre le tecniche citofluorimetriche, suggerite in altre specie animali hanno evidenziato più scarsi risultati (2). Il microematocrito ha evidenziato una correlazione con i risultati ottenuti dal HCT automatizzato a conferma della qualità della metodica automatizzata. Tuttavia i risultati ottenuti si sono mostrati lievemente differenti, in quanto valutati diversamente (PCV= metodica diretta, HCT= ottenuto per calcolo da RBC x MCV).

Al contrario le metodiche citofluorimetriche hanno evidenziato una scarsa correlazione con la formula leucocitaria su vetrino che va pertanto considerata come la tecnica preferibile nonostante risulti più lunga ed indaginosa.

CONCLUSIONI

L'utilizzo di metodiche automatizzate mediante contaglobuli ad impedenza e stima del rapporto TL/E con analizzatore d'immagine sembrano essere utili per la valutazione dei dati ematologici nell'orata.

Le tecniche citofluorimetriche, seppur rapide e poco costose, non sembrano al contrario fornire sostanziali vantaggi rispetto alla valutazione morfologica manuale, a differenza di quanto evidenziato in altre specie di pesci di acqua dolce (2).

BIBLIOGRAFIA ESSENZIALE

1. Stoskopf M. (1993) : Clinical pathology in: Fish Medicine, Stoskopf ed, WB Saunders, 113-131



2. Inoue, et al., (2002), *Fish & Shellfish Immunology*, 13, 379-390
3. Jensen et al (2006) *Vet Clin Pathol*, 35, 276-286

Figura 1: citogrammi relativi al sangue di orata incubato con DiOC6. Il citogramma a destra rappresenta le caratteristiche di scatter relative alle sole cellule DiOC6 positive

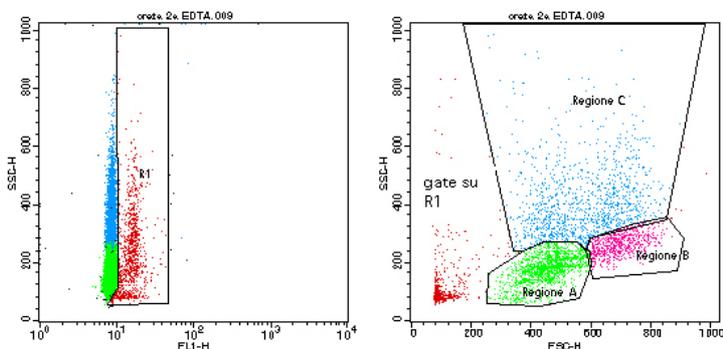


Tabella 1: Risultati ematologici (media \pm d.s. e range) dei 26 campioni di sangue di orata esaminati

Parametro	Unità	Med.	\pm	d.s.	range
cellule totali	<i>milioni/mmc</i>	3,07	\pm	0,43	(2,63-3,98)
HCT	%	47,30	\pm	6,50	(36,9-55,3)
PCV (man)	%	46,35	\pm	6,92	(38-58)
TL/E (% trombociti + leucociti)	%	2,73	\pm	0,66	(1,43-5,00)
trombociti+ leucociti	<i>migliaia/mmc</i>	83,45	\pm	6,47	(69-94)
trombociti	%	17,64	\pm	10,48	(10-25)
linfociti	%	56,73	\pm	12,42	(36-72)
monociti	%	4,45	\pm	3,09	(1-11)
acidofili	%	12,09	\pm	6,25	(3-30)
neutrofili	%	9,00	\pm	4,63	(1-19)
basofili	%	0,09	\pm	0,20	(0-1)
% DiOC6 pos.	%	14,15	\pm	8,21	(3,07-34,54)
regione A (linfo + trombociti)	%	59,38	\pm	24,46	(35,72-82,26)
regione B (monociti)	%	21,69	\pm	17,24	(5,98-50,26)
regione C (polimorfonucleati)	%	18,93	\pm	10,85	(6,46-26,23)

Tabella 2: Valori di imprecisione ottenuti mediante prove di ripetizione per i differenti parametri valutati.

Parametro	Metodica	CV (%)
Cellule nucleate/mmc	impedenza	1,5%
HCT (%)	impedenza	1,6%
TL/E (%)	analizzatore immagine	9,7%
% DiOC6 pos.	citofluorimetrica	10,4%
% regione A	citofluorimetrica	4,8%
% regione B	citofluorimetrica	13,2%
% regione C	citofluorimetrica	11,6%

EVALUATION OF AUTOMATED DETERMINATION OF HEMATOLOGICAL PARAMETERS IN GILTHEAD SEA BREAM (*Sparus aurata*)

Hematological parameters in gilthead sea bream were automatically evaluated. Total nucleated cells, (RBC + thrombocytes + WBC), MCV, hematocrit, and hemoglobin were evaluated using an impedance analyzer. PCV using a micro-hematocrit tube and the ratio between RBC and thrombocytes+WBC using an image analyzer were evaluated. The percentage of DiOC6 positive cells, i.e the percentage of thrombocytes and leukocytes, was recorded using a flow cytometer and different cell populations according to scatter properties were compared with manual differentials. Results from impedance analyzer were accurate and imprecision was acceptable. No correlations were found between results obtained in flow cytometric and on blood smear. The multiple approach using different techniques is rapid and reproducible but adequate reference values for gilthead sea bream are recommended.

Key words: haematology, gilthead sea bream, flow cytometry.

DATI PRELIMINARI SULLE VARIAZIONI DELLE SOTTOPOPOLAZIONI LINFOCITARIE E DELLA FRAZIONE APOPTOTICA NEL LATTE E NEL SANGUE PERIFERICO DI BOVINE IN ASCIUTTA

Gelain ME, Daprà V, Piccinini R, Zecconi A.

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

I moderni sistemi di allevamento puntano alla riduzione dell'incidenza delle patologie che influenzano negativamente la produzione negli allevamenti da latte. Diversi studi hanno valutato le difese immunitarie aspecifiche come elemento essenziale per la valutazione dello stato di salute della bovina. La maggior parte di questi lavori sono stati effettuati su allevamenti sperimentali durante il periparto. Scopo di questo lavoro è invece quello di definire le sottopopolazioni linfocitarie e valutare il tasso di apoptosi dei linfociti nel latte e nel sangue periferico di bovine in asciutta provenienti da allevamenti commerciali per valutare eventuali variazioni dello stato immunitario della bovina e della mammella. L'analisi citofluorimetrica delle sottopopolazioni linfocitarie e dei livelli di apoptosi sono stati valutati su campioni di sangue periferico e di latte, prelevato dai quattro quarti, di 6 bovine, di cui almeno uno presentava livelli di cellule somatiche (SSC) inferiori a 100.000 cell/ml e negative all'esame batteriologico. I campioni di latte e sangue periferico sono stati prelevati 7 giorni prima della messa in asciutta e all'inizio dell'asciutta e in campioni di sangue prelevati 14 e 28 giorni dopo l'inizio dell'asciutta. I risultati non hanno evidenziato differenze significative tra i prelievi nei livelli di apoptosi sia nel latte che nel sangue. Nel sangue periferico sono rimasti invariati il rapporto CD4:CD8 (1.8 ± 0.8) e i livelli di linfociti T- $\delta\gamma$ e WC1. Una maggior variabilità si è invece evidenziata nel latte sia per i valori di CD4 e sia di CD8, con una tendenza all'aumento dei CD8, a conferma della diversa ripartizione delle sottopopolazioni linfocitarie fra sangue periferico e tessuti, in funzione anche dello stato sanitario della mammella.

Parole chiave: bovine da latte, asciutta, citofluorimetria, linfociti.

INTRODUZIONE

Le alterazioni della funzionalità del sistema immunitario, durante il periparto, sono alla base della maggior suscettibilità a patologie infettive, come le mastiti, che influenzano negativamente la produzione latte⁽¹⁾. La valutazione della distribuzione delle sottopopolazioni leucocitarie, nel sangue periferico e nella mammella, possono essere utili indicatori dell'andamento della risposta immunitaria e possono quindi essere d'aiuto nel definire eventuali strategie profilattiche per aumentare la resistenza ai patogeni⁽¹⁾. Molti studi hanno focalizzato l'attenzione sul ruolo della funzionalità dei granulociti neutrofili nella difesa della mammella⁽²⁾, mentre variazioni delle sottopopolazioni linfocitarie, nel sangue periferico e nel latte, sono state esaminate in lavori condotti su animali provenienti da allevamenti sperimentali durante il periparto^(3,4). Scopo di questo lavoro è invece quello di definire le sottopopolazioni linfocitarie e valutare il tasso di apoptosi dei linfociti nel latte e nel sangue periferico di bovine in asciutta provenienti da allevamenti commerciali per valutare eventuali variazioni dello stato immunitario della bovina e della mammella.

MATERIALI E METODI

Sono stati analizzati campioni di sangue periferico e latte, prelevato dai quattro quarti di cui almeno uno con livelli di cellule somatiche (SSC) inferiori a 100.000 cell/ml e negativi all'esame batteriologico, di 6 bovine provenienti da allevamenti commerciali. I campioni di latte e sangue periferico sono stati prelevati 7 giorni prima della messa in asciutta (T-7) e all'inizio dell'asciutta (T-As) e in campioni di sangue prelevati 14 (A-14) e 28 (A-28) giorni dopo l'inizio dell'asciutta. In ciascun campione sono state valutate, le sottopopolazioni linfocitarie (CD4, VPM65, Serotec; CD8, CC63, Serotec; $\gamma\delta$, CACTB14A, VMRD; WC1, IL-A29, VMRD) e la percentuale di linfociti in apoptosi (AnnexinV-FITC Apoptosis detection kit, MBL) tramite analisi citofluorimetrica (FacsSort, Becton Dickinson; software CellQuest).

RISULTATI

Non si sono rilevate variazioni significative nel numero di linfociti in apoptosi, sia nel sangue sia nel latte, tra i vari prelievi (Tab.1, Tab.2). L'analisi delle sottopopolazioni linfocitarie nel sangue ha evidenziato una tendenza all'aumento sia dei CD4 sia dei CD8,

senza alterazioni del rapporto. Una maggior variabilità si è invece evidenziata nel latte sia per i valori di CD4 e sia di CD8, con una tendenza all'aumento dei CD8.

DISCUSSIONE

L'efficacia della risposta immunitaria si basa sull'interazione tra le differenti popolazioni cellulari ed in particolare tra le sottopopolazioni linfocitarie. Alterazioni nel loro rapporto o nella loro capacità di migrare nei tessuti possono influenzare la risposta immunitaria sistemica e locale¹. Nel nostro lavoro abbiamo potuto notare una tendenza all'aumento dei linfociti T CD4+ e CD8+ nel sangue periferico, durante l'asciutta, senza variazioni significative nel loro rapporto. In letteratura sono presenti dati contrastanti riguardo l'andamento delle sottopopolazioni linfocitarie nel periparto: alcuni autori hanno evidenziato una diminuzione dei linfociti T, in particolare CD4+^{1,5}. Altri, al contrario, non hanno riscontrato variazioni significative nelle percentuali di CD4 e CD8^{4,6}. Anche i dati riguardanti il rapporto CD4:CD8, spesso usato come indicatore di alterazioni del sistema immunitario, non sono concordi, con valori molto variabili, da 1,53:1 a 3:1, con picchi di 3,6:1 al parto^{1,4,7}, mentre nel nostro caso non ha mai superato valori pari a 2:1. Nel latte, al contrario, i valori di cellule CD8+ sono maggiori rispetto alle cellule CD4+, così come già precedentemente segnalato^{4,8} ed è evidente una loro tendenza ad aumentare dal primo al secondo prelievo. Dato il ruolo di linfociti citotossici e suppressor delle cellule CD8+, è probabile che la loro funzione sia quella di modulare la risposta immunitaria nella mammella e, probabilmente, nell'intestino del vitello⁹. I livelli di linfociti in apoptosi non hanno evidenziato differenze significative tra prelievi. In letteratura sono presenti dati riguardanti principalmente le percentuali di apoptosi a carico dei granulociti neutrofili² nel latte, mentre non sono a disposizione dati riguardanti i linfociti.

CONCLUSIONI

Questi dati preliminari confermano la diversa ripartizione delle sottopopolazioni linfocitarie tra sangue periferico e ghiandola mammaria ed una loro tendenza a variare in funzione dello stato funzionale della mammella. Le indagini sullo stato immunitario e sulle condizioni sanitarie sono ancora in corso per monitorare le variazioni delle popolazioni linfocitarie e l'insorgenza di eventuali patologie dopo il parto.

BIBLIOGRAFIA

1. Van Kampen C. et al.: Effects of peripartum stress and health on circulating bovine lymphocyte subsets. *Vet Immunol Immunopathol* 1997, 59:79-91.
2. Van Oostveldt et al.: Apoptosis and necrosis of blood and milk polymorphonuclear leukocytes in early and midlactating healthy cows. *Vet Res.* 2001; 32:617-22.
3. Asai K. et al.: Variation in CD4+ T and CD8+ T lymphocyte subpopulations in bovine mammary gland secretions during lactating and non-lactating periods. *Vet Immunol Immunopathol.* 1998; 65:51-61.
4. Park YH et al.: Bovine mononuclear leukocyte subpopulations in peripheral blood and mammary gland secretions during lactation. *J Dairy Sci.* 1992; 75:998-1006.
5. Kimura K. et al.: Phenotype analysis of peripheral blood mononuclear cells in periparturient dairy cows. *J Dairy Science*, 1999, 82:315-319.
6. Harp JA et al.: Numbers and percent of T lymphocytes in bovine peripheral blood during the periparturient period. *Vet Immunol Immunopathol.* 1991, 28:29-35.
7. Shafer-Weaver KA et al.: Diminished mammary gland lymphocyte functions parallel shifts in trafficking patterns during the postpartum period. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1996, 212:271-80.
8. Harp JA et al.: Lymphocyte subsets and adhesion molecule expression in milk and blood of periparturient dairy cattle. *Vet Immunol Immunopathol.* 2004, 102:9-17.
9. Van Kampen C et al.: Adhesion molecules and lymphocyte subsets in milk and blood of periparturient Holstein cows. *Vet Immunol Immunopathol.* 1999; 69:23-32.

SANGUE	CD4	CD8	$\gamma\delta$	WC1	APOPTOSI
T7	26,6 ± 1,9	15,1 ± 2,4	4,6 ± 1,6	4,9 ± 1,9	6,21 ± 1,68
T-As	29,1 ± 7,2	17,2 ± 4,4	4,5 ± 2,0	5,3 ± 2,1	5,6 ± 1,14
A-14	32,2 ± 5,2	18,2 ± 3,5	4,7 ± 1,3	5,9 ± 1,6	5,6 ± 1,22
A-28	33,7 ± 5,6	20,9 ± 4,2	5,6 ± 1,5	5,6 ± 2,4	6,5 ± 1,88

Tabella 1: Valori percentuali delle sottopopolazioni linfocitarie e dei linfociti in apoptosi nel sangue periferico (Media± DS). T-7: 7 gg prima della messa in asciutta; T-As: inizio dell'asciutta; A-14: 14 gg dopo l'inizio dell'asciutta; A-28: 28 gg dopo l'inizio dell'asciutta.

LATTE					
APOPTOSI	AD	AS	PD	PS	
T7	16,1 ± 7,06	12,08 ± 6,32	15,37 ± 5,21	14,61 ± 6,89	
T-As	12,4 ± 2,37	11,29 ± 2,53	12,34 ± 5,13	13,47 ± 4,51	
CD4					
T7	16,66 ± 7,09	21,30 ± 7,03	17,88 ± 5,84	19,49 ± 6,59	
T-As	23,29 ± 9,63	21,87 ± 7,54	20,47 ± 6,00	26,11 ± 11,88	
CD8					
T7	21,90 ± 11,45	19,66 ± 8,51	20,09 ± 9,76	24,85 ± 8,58	
T-As	31,43 ± 8,90	22,69 ± 4,38	31,91 ± 11,68	30,25 ± 8,29	

Tabella 2: Valori percentuali delle sottopopolazioni linfocitarie e dei linfociti in apoptosi nel latte (Media± DS). AD: quarto anteriore dx; AS: quarto anteriore sx; PD: quarto posteriore dx; PS: quarto posteriore sx.

CHANGES IN APOPTOSIS RATE AND LYMPHOCYTES SUBSET IN MILK AND PERIPHERAL BLOOD IN DAIRY COWS DURING DRY PERIOD

The current dairy health management requires to keep a difficult balance among different management and physiological factors as mean to reduce disease affecting production such as mastitis. Several studies addressed the assessment of non-specific immune defences as an essential step in evaluation of the health status of cattle, most of them performed in research herds or in experimental animals during periparturient period. Aim of this work is to assess the changes in lymphocytes subset and apoptosis rate of lymphocytes in milk and peripheral blood at drying-off and during dry period. Six cows from commercial dairy herd were used. Flow cytometric evaluation of apoptotic lymphocytes and percentage of lymphocytes subset were done on peripheral blood and milk from all quarters with at least one quarter with somatic cell count lower than 100.000 cells/ml and bacteriologically negative. Animal were sampled 4 times: milk and blood samples were taken 7 days before drying-off, at drying-off and blood samples were also taken 14 and 28 days after drying-off. Result showed no changes in apoptotic rate in lymphocytes in blood and milk and constant values of CD4: CD8 ratio, T- $\delta\gamma$ and WC1 lymphocytes. On contrary, in milk, CD4 and CD8 levels showed higher variability, with an increased of CD8 as a confirm of the differences between systemic and local changes in lymphocytes subset.

Key words: cattle, drying-off, flow cytometry, lymphocytes.

ALTERAZIONI ISTOPATOLOGICHE BRANCHIALI IN ZEBRAFISH ADULTI INDOTTE DALLA ESPOSIZIONE ACUTA A DISINFETTANTI: MODELLO SPERIMENTALE

Michela Gregori*, Carlo Pretti*, Luigi Intorre^o, Giovanni Braca*, Francesca Abramo*

* Dipartimento di Patologia Animale, Università di Pisa

^o Sezione di Farmacologia e Tossicologia, Dipartimento di Clinica Veterinaria, Università di Pisa

Sono stati valutati gli effetti di una esposizione acuta a quattro disinfettanti di comune impiego in acquacoltura (formalina, potassio permanganato, benzalconio cloruro, verde malachite) in un modello sperimentale con adulti di Zebrafish (*Danio rerio*). Gruppi di 8 individui sono stati esposti ad una dose di ciascun disinfettante pari alla concentrazione terapeutica (TD) ed a 5 volte la stessa (5xTD). Lo studio istologico delle branchie ha permesso di rilevare un range di alterazioni morfostrutturali rappresentate da proliferazione delle cellule interlamellari con obliterazione parziale degli spazi tra lamelle secondarie, sollevamento, distacco dell'epitelio respiratorio, modesto infiltrato flogistico leucocitario e necrosi dell'epitelio delle lamelle. Le alterazioni di maggiore gravità, rappresentate da distorsione e necrosi apicale delle lamelle secondarie, sono state rilevate nel caso di esposizione a potassio permanganato e sono correlabili alle proprietà chimiche del sale ed alla sua capacità di interagire con substrati biologici.

Parole chiave: disinfettanti, zebrafish, tossicità acuta, branchie, istopatologia

GILL HISTOPATHOLOGY IN ADULT ZEBRAFISH MODEL FOLLOWING EXPOSURE TO AQUACULTURAL DISINFECTANTS

The effect of acute exposure of four disinfectants commonly used in aquacultural practice (formalin, potassium permanganate, benzalkonium chloride and malachite green), was studied on the gill structure of adult Zebrafish (*Danio rerio*) using histopathology as an endpoint. Lots of 8 individuals were exposed to a dose of each disinfectant corresponding to the therapeutic dose (TD) and five folds of the therapeutic dose (5xTD). Hystological evaluation of dead zebrafish showed different patterns of gill alterations ranging from a slightly focal proliferation of interlamellar cells with obliteration of interlamellar spaces, mild inflammatory reaction with leucocyte infiltration, lifting of the epithelial layer to distortion and necrosis of gill lamellae. Fish exposed to potassium permanganate showed the more severe histopathological changes consisting on distorsion and apical necrosis of secondary lamellae. The histological alterations induced by potassium permanganate correlate with the well known toxic effect of this salt which is an highly reactive chemical with biocidal properties.

Key words: disinfectants, zebrafish, acute toxicity, gill histopathology

STUDIO BIOCHIMICO E IMMUNOISTOCHEMICO SULLA MELANOSI DEL SUINO NERO SICILIANO

Lanteri G., Marino F., Laganà G.^o, Bellocco E.^o, Liotta L.*^o, Macrì B.

*Dip. Sanità Pubblica Veterinaria, ^oDip. Chimica Organica e Biologica, *Dip. MOBIFIPA, Università degli Studi di Messina, Polo Universitario dell'Annunziata, 98168 Messina*

In questo studio vengono condotte analisi immunoistochimiche e istochimiche su linfonodi di suini neri siciliani colpiti dalla melanosì, nonché biochimiche e istochimiche su ghiande, volte a supportare l'ipotesi patogenetica alimentare. La reazione immunoistochimica, effettuata su sezioni di tessuto linfonodale, utilizzando il Macrophage marker, metteva in evidenza diversi macrofagi contenenti variabili quantità di granuli di pigmento. Le diverse concentrazioni testate per l'anticorpo anti-human melanoma non hanno evidenziato alcun tipo di reazione, escludendo così l'ipotesi di melanoma. La reazione per l'S-100 dava anch'essa esito negativo. La reazione di Millon metteva in evidenza una colorazione giallo-rossastra, confermando la presenza di tirosina nel tessuto linfonodale. Le prove istochimiche per la tirosinasi hanno mostrato variazioni colorimetriche che confermavano la presenza dell'enzima nelle ghiande. I risultati ottenuti dalla determinazione quantitativa dell'attività tirosinasi negli estratti dei campioni di ghianda analizzati, hanno messo in evidenza che tale attività è presente per la maggior parte in forma latente, come riportato in letteratura per altre specie vegetali. In conclusione, i dati riportati rafforzano l'ipotesi patogenetica suggerita dell'ingestione di ghiande quale causa di melanosì. La tirosinasi presente nelle ghiande potrebbe avviare il processo di catalisi per la formazione della melanina agendo sul substrato di tirosina presente nei tessuti del suino. Resta da quantificare il contenuto di tirosina nei vari tessuti, sebbene con la reazione di Millon ne sia già stata dimostrata la presenza, e da effettuare l'induzione sperimentale di melanosì.

Parole chiave: melanosì; ghianda; suino nero siciliano; immunoistochimica; patogenesi

BIOCHEMICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY ON MELANOSIS OF NERO SICILIANO PIG

In the present study, immunohistochemical and histochemical analyses were carried out on melanotic lymph nodes of Nero Siciliano pig, as well as biochemical and histochemical exams on acorn, to confirm the alimentary pathogenesis suggested. The immunohistochemically reaction, carried out on lymph node sections, using the Macrophage marker, put in evidence various macrophages containing variable amounts of pigment grains. The various dilutions used for the anti-human melanoma antibody did not showed any reaction, excluding therefore the melanoma hypothesis. The reaction for the S-100 protein was negative. The Millon's reaction put in evidence a yellow-red colouration, confirming the presence of tyrosine in the lymph node tissue. The histochemical tyrosinase test showed colorimetric variations which confirmed the presence of the enzyme in the acorn. Results obtained from the quantitative determination of the tyrosinase activity in the extracts of the samples of acorn analyzed, showed that such activity is mainly present in latent form, as already known in literature for other vegetables. In conclusion, data here reported support the pathogenetic hypothesis of the ingestion of acorns as possible cause of melanosì. The presence of tyrosinase in the acorn could start the process of catalysis for the formation of the melanin, acting on the substrate of tyrosine present in the tissues of swine. The amount of tyrosine in the different tissues, although the Millon's reaction demonstrated yet the presence, as well as the experimental induction of melanosì remain to be carried out.

Key words: melanosì; acorn; nero siciliano pig; immunohistochemistry; pathogenesis

**MYCOPLASMA OVIPNEUMONIAE E LA POLMONITE ATIPICA DEGLI OVINI IN ITALIA:
REPERTI ANATOMO-PATOLOGICI ED IMMUNOISTOCHEMICI**

Loria Guido Ruggero¹, Di Marco Vincenzo¹, Monteverde Vincenzo¹, Militello Claudia¹, Nicholas Robin², Radaelli Enrico³, Scanziani Eugenio³

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia; ²Mycoplasma Laboratory, Veterinary Laboratories Agency- Weybridge, UK; ³Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Sezione di Anatomia; Patologica Veterinaria e Patologia Aviaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Milano.

Anche in Italia, *Mycoplasma ovipneumoniae* è riconosciuto agente responsabile della “polmonite atipica” (“atypical pneumonia”) degli ovini, patologia così denominata per distinguerla dalla classica “polmonite enzootica acuta” o Pasteurellosi (Loria *et al.*, 1999; Loria *et al.* 2006).

Gli autori riportano i dati di una indagine, effettuata in Sicilia al macello, su un totale di 987 agnelli, di età compresa tra 1 e 3 mesi, in cui è stata osservata la malattia in 30 casi (3%). Nel 70% dei soggetti colpiti *M.ovipneumoniae* è stato isolato in associazione con *Mannheimia* sp. e *Pasteurella* sp. mentre non è stata confermata la presenza di virus. All’esame anatomico-patologico le lesioni più frequenti erano costituite da differenti gradi (10 al 50% del parenchima polmonare) di consolidamento polmonare (epatizzazione rossa e grigia) a carico dei lobi apicali e medi e da aumento di volume ed edema dei linfonodi mediastinici. Nel 90% dei casi la lesione era bilaterale. L’osservazione dei polmoni dalla superficie diaframmatica denotava una più vasta compromissione del parenchima (>40%). La demarcazione con il tessuto sano era netta e raro il riscontro di pleurite. All’esame istologico le due maggiori componenti di questa forma di polmonite erano la polmonite interstiziale e l’iperplasia reattiva del tessuto linfoide bronco-associato. La componente infiammatoria (quando esclusivamente legata all’isolamento di *M. ovipneumoniae*) era caratterizzata da infiltrati monocitari interstiziali e presenza di macrofagi in sede alveolare. L’esame immunohistochemico per citocheratine ha evidenziato una marcata iperplasia e metaplasia degli epitelii bronchiali e bronchiolari. I risultati della presente ricerca indicano che la polmonite atipica degli ovini è una patologia presente seppur in bassa prevalenza nel comprensorio siciliano e che le lesioni sono caratteristiche e meritevoli di ulteriori studi.

Parole chiave: *Mycoplasma ovipneumoniae*, ovini, patologia

**MYCOPLASMA OVIPNEUMONIAE, THE CAUSE OF ATYPICAL OVINE PNEUMONIA:
PATHOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDIES**

In Italy, *Mycoplasma ovipneumoniae* has been recently confirmed as a pathogen responsible for “atypical pneumonia”, which is so called in order to distinguish it from the other classic “enzootic pneumonias” of sheep or pasteurellosis (Loria *et al.*, 1999; Loria *et al.* 2006).

Authors report data on a survey carried out in a Sicilian abattoir on 987 lambs, aged from 1 to 3 months, which identified 30 infected animals (about 3%). Among infected lambs, 70% were also found positive for *Mannheimia* sp. e *Pasteurella* sp. No viruses were isolated or detected. Anatomico-pathological examination showed different degrees of consolidated lungs, ranging from 10 to 50% of the parenchyma (with red and grey hepatisation) involving the apical and medium lobes with swelling and oedema of mediastinal lymph-nodes. In almost all cases (90%) both lungs were involved. Diaphragmatic surfaces of lungs were more often involved than the thoracic area (>40%). Border between healthy and affected tissue were clear and pleuritis was rarely observed.

Histopathology showed two major findings: interstitial pneumonia and hyperplasia of lymphoid tissue of the bronchi. Infiltration of inflammatory cells (where only *M. ovipneumoniae* was isolated) were characterised by monocytes and macrophages in the interstitial and alveolar spaces. Immunohistochemistry for cytokeratin showed marked hyperplasia and metaplasia of bronchial epithelium. The present study confirmed that atypical pneumonia is present with low but significant (?) prevalence in Sicily, and pathological findings are peculiar of the infection and need further investigations.

Key words: *Mycoplasma ovipneumoniae*, lamb, pathology

DUE CASI DI CARCINOMATOSI LEPTOMENINGIALE NEL CANE

Mandara Maria Teresa, Pavone Silvia, Ricci Giovanni, Giovanni Angeli*

*Dipartimento di Scienze Biopatologiche ed Igiene delle Produzioni Animali e Alimentari, *Dipartimento di Patologia, Diagnostica e Clinica Veterinaria - Facoltà di Medicina Veterinaria di Perugia*

La Carcinomatosi Leptomeningiale (CL), nota anche come “meningite neoplastica”, è una patologia tumorale caratterizzata da una infiltrazione leptomeningiale diffusa, focale o multifocale, da parte di cellule maligne, a partire da un tumore solido. In medicina umana essa colpisce circa il 5% dei pazienti affetti da cancro, mentre in medicina veterinaria resta ancora una patologia rara, riportata solo in casi isolati nel cane, nel gatto e nel cavallo. In questo lavoro vengono descritti due casi di CL nel cane.

Il caso n.1 riguarda un cane Setter di 6 anni, femmina, la cui anamnesi riferisce la presenza di tumori mammari, con metastasi polmonari, e la comparsa improvvisa di cecità amaurotica. Il caso n.2 riguarda un cane Pastore maremmano adulto, femmina, affetto da tumore delle cavità nasali, in assenza di segni neurologici. Campioni tissutali sono stati fissati in formalina neutra tamponata, inclusi in paraffina e sottoposti a indagine IHC, eseguita mediante anticorpi monoclonali per pancitocheratina (CK) (clone MNF116, Dako), vimentina (clone V9, Dako) e sinatpofisina (clone SY98, Dako).

Nel caso n.1 l'esame istologico dei noduli mammari e polmonari identificò un carcinoma tubulopapillifero, con ampie aree solide. Nella loggia ipofisaria fu evidenziato un tessuto neoplastico CK-positivo, che infiltrava le meningi ipofisarie e l'osso basisfenoide adiacente, fino ad avvolgere il chiasma ottico. Nel caso n.2 fu confermata la presenza di un tessuto neoplastico nelle cavità nasali e nei seni frontali, istologicamente riferibile a carcinoma transizionale. In cavità cranica era presente del materiale gelatinoso a ridosso dei bulbi olfattori e lobi frontali, nel quale furono osservati clusters di cellule neoplastiche CK-positive. Isolati clusters e cellule neoplastiche CK-positive furono rinvenute anche nello spazio subaracnoideo del pavimento encefalico e della corteccia parieto-temporale.

Nel caso n.1 la disseminazione ematogena delle cellule cancerose ha interessato in modo singolare solo le meningi della fossa ipofisaria e di qui il basisfenoide o, viceversa, finendo per danneggiare il chiasma ottico e i nervi ottici intracranici, da cui la cecità amaurotica. Nel caso n.2 la patogenesi della CL prevede una più comune estensione diretta del tumore dalle cavità nasali, senza tuttavia aver dato segni neurologici evidenti.

Parole chiave: carcinomatosi leptomeningiale, Sistema Nervoso Centrale, amaurosi, tumore

TWO CASES OF CANINE LEPTOMENINGEAL CARCINOMATOSIS

Leptomeningeal carcinomatosis (LC), also called “neoplastic meningitis”, is a neoplastic disorder characterized by a diffuse, focal or multifocal meningeal infiltration of malignant cells deriving from a solid tumour. In human beings it occurs in approximately 5% of patients with cancer, while in veterinary medicine it remains an uncommon lesion, with only a handful of cases in dog, cat and horse.

In this study we reported two cases of canine LC. In the case n.1 LC was a complication of an anaplastic solid mammary carcinoma in a Setter, female, six-year-old dog. It unusually involved hypophyseal leptomeninges after hematogenous spread and, from here, it gained basisphenoid bone by direct extension, or viceversa. The case n.2 occurred in an adult Pastore maremmano male dog, affected by a transitional carcinoma of nasal cavity that produced a direct seeding of cancerous clusters in epidural and subarachnoid space of the brain, without neurological signs.

Key words: leptomeningeal carcinomatosis, Central Nervous System, amaurosis, tumour

SINDROME VESTIBOLARE IN UN BOXER CON MEDULLOBLASTOMA CEREBELLARE**Mandrioli Luciana⁽¹⁾, Panarese Serena⁽¹⁾, Biserni Roberta⁽²⁾, Gandini Gualtiero⁽²⁾, Bettini Giuliano⁽¹⁾**

⁽¹⁾Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, ⁽²⁾Dipartimento Clinico Veterinario, Facoltà di Medicina Veterinaria Alma Mater Studiorum, Università di Bologna

Si descrive il caso di un cane Boxer di quattro anni presentato per atassia progressiva, nistagmo ed head tilt refrattari alle terapie antibiotica e cortisonica. L'esame neurologico rilevava una sindrome vestibolare centrale, e le immagini TC evidenziavano una massa intrassiale a carico dell'emisfero cerebellare sinistro. Il cane era sottoposto ad eutanasia e l'esame autoptico evidenziava una massa gelatinosa rosa chiaro debordante l'emisfero cerebellare sinistro, che si sostituiva al lobo flocculonodulare e determinava la distorsione del quarto ventricolo. L'esame istologico rivelava un tessuto neoplastico originato dallo strato esterno dei granuli, costituito da numerosi nidi di cellule poligonali fittamente stipate ("small blue cells") che tendevano ad invadere le leptomeningi e gli spazi di Virchow-Robin, cui era frammista una popolazione minoritaria di cellule fusate e stellate. L'immunoistochimica (IIC) per diversi marcatori tissutali (NSE, NFP, S100, GFAP, sinaptofisina, vimentina, CD3, CD79, CD117, citocheratine AE1/AE3), antigeni associati al ciclo cellulare (Ki67) e "checkpoints" del ciclo cellulare (p53, bcl-2, subunità catalitica della telomerasi) confermava l'origine neuronale del MB, mostrandone una differenziazione gliale. L'attività telomerasica, valutata anche con una tecnica PCR-ELISA, manifestava valori molto elevati, suggerendo un preferenziale utilizzo della via telomerasica dalle cellule del MB per sfuggire ai meccanismi di controllo del ciclo cellulare.

Parole chiave: cane, medulloblastoma, immunoistochimica, attività telomerasica.

INTRODUZIONE

Il medulloblastoma cerebellare (MB) è il più comune tumore maligno primitivo del SNC nel bambino; insorge a livello di fossa caudale e origina presumibilmente dai precursori delle cellule dei granuli. Negli animali è raro e più spesso descritto negli adulti; in particolare nel cane è segnalato fra i 3 e i 10 anni (Steinberg e Galbreath, 1998).

ANAMNESI E DATI CLINICI

Un cane Boxer di quattro anni è stato presentato alla visita per atassia vestibolare progressiva ed head tilt sinistro, refrattari alle terapie antibiotica e cortisonica. L'esame neurologico documentava una sindrome vestibolare centrale, caratterizzata da stato mentale fortemente depresso, tendenza alla compulsione con modico drifting sinistro. Erano altresì rilevabili ritardo della funzione propriocettiva cosciente del bipede sinistro e risposta alla minaccia diminuita bilateralmente. Le immagini TC post contrasto evidenziavano una lesione intrassiale occupante spazio a carico dell'emisfero cerebellare sinistro, caratterizzata da un pattern infiltrativo (margini e forma non ben definibili) e dalla acquisizione irregolare del mezzo di contrasto. Il rapido peggioramento del soggetto aveva indotto ad effettuare l'eutanasia, a cui ha fatto seguito l'esame autoptico. L'esame macroscopico del sistema nervoso centrale evidenziava una massa gelatinosa rosa chiaro debordante l'emisfero cerebellare sinistro (Fig.1) che si sostituiva al lobo flocculonodulare e determinava una distorsione del quarto ventricolo. Null'altro di rilevante a carico degli altri organi.

MATERIALI E METODI

Campioni prelevati in sede necroscopica sono stati fissati in formalina tamponata, inclusi in paraffina, sezionati a 4 µm e colorati con ematossilina eosina.

Ulteriori sezioni della massa cerebellare sono state valutate con immunoistochimica (IIC). In breve, le sezioni sono state sottoposte a sparaffinatura, reidratazione ed inibizione delle perossidasi endogene. Il pannello IIC adottato ha compreso gli anticorpi verso sinaptofisina (1:20), NSE (1:600), GFAP (1:8000), S100 (1:1600), vimentina (1:100), CD117 (1:100), pancitocheratina AE1/AE3 (1:50), MIB1 (1:30) (forniti da Dako), h-TERT (1:50, Novocastra), bcl-2 (prediluito, Biogenex), p53 (1:50, Neomarkers). La seconda parte della metodica IIC, comune a tutti gli

anticorpi impiegati, ha previsto l'incubazione overnight a 4°C, lavaggi ripetuti con tampone, l'applicazione del complesso rivelatore (kit commerciale LSAB, Dako), l'impiego di diaminobenzidina (0.04% per 7'), la colorazione di contrasto (Ematossilina di Papanicolaou), la disidratazione ed il montaggio. In funzione di ciascun anticorpo sono stati selezionati adeguati controlli positivi; come controllo negativo è stato impiegato un anticorpo dello stesso isotipo ma d'irrelevante specificità. Sulla base del numero di cellule positive i casi sono stati suddivisi rispettivamente in +/-, +, ++ e +++.

In sede autoptica, una porzione di tessuto neoplastico è stata congelata in azoto liquido, stoccata a -80°C, e processata con metodica PCR per amplificazione delle estremità telomeriche (Telomerase Repeat Amplification Protocol-TRAP) con sistema di rivelazione ELISA. Il kit "TeloTAGGG telomerase PCR ElisaPlus" (Roche) rappresenta un test in vitro per la valutazione dell'attività telomerasica. Il principio su cui si basa il test prevede l'aggiunta, operata dalla telomerasi (se presente nel pool proteico ottenuto), di ripetizioni telomeriche (TTAGGG)_n all'estremità 3' di una sonda oligonucleotidica sintetica che rappresenta il substrato dell'enzima, che in virtù della marcatura con biotina, può aderire alla superficie della micropiastra da titolazione, streptoavidinata. Questi prodotti sono quindi amplificati mediante PCR utilizzando primer specifici. La loro visualizzazione avviene con un sistema immuno-enzimatico mediante reazione colorimetrica in ELISA. L'assorbanza dei campioni è stata misurata alla lunghezza d'onda (λ) uguale a 450nm, con una λ di riferimento di 690nm (bianco). I campioni sono stati considerati telomerasi positivi quando $\Delta A > 0,20$ ($\Delta A = A_{450nm} - A_{690nm}$). Il limite prescelto rappresenta il valore di riferimento del testicolo di cane normale, distretto che fisiologicamente è dotato di questa specifica attività enzimatica.

RISULTATI

L'esame istologico rivelava un tessuto neoplastico originato dallo strato esterno dei granuli costituito da numerosi nidi di cellule poligonali fittamente stipate ("small blue cells") (Fig 2), che tendevano ad invadere le leptomeningi e gli spazi di Virchow-Robin, cui era frammista una popolazione minoritaria di cellule fusate e stellate e focolai di calcificazione distrofica (diagnosi istologica: medulloblastoma). Concomitavano inoltre aspetti di edema e iperemia del neuropilo ed ipertrofia delle cellule endoteliali.

L'immunoreattività per marcatori neuronali quali sinaptofisina (Fig 3a) ed NSE confermava l'origine cerebellare del MB, mostrando inoltre una tendenza alla differenziazione gliale (GFAP++) (Fig 3b). Le tipiche "small blue cells" esprimevano inoltre in modo apprezzabile la vimentina (+++), CD117 (+) e citocheratina AE1/AE3 (+). Si apprezzava inoltre una intensa attività proliferativa (MIB1 ++) (Fig 3c) ed un moderato segnale positivo per h-TERT (+) "speckled" nelle attese localizzazioni nucleolare e nucleare (Fig 3d).

L'attività telomerasica (AT), valutata con metodica TRAP ELISA, manifestava valori di assorbanza (misurata in lunghezza d'onda) decisamente elevati, pari a $AT = 0,512 \lambda$ (AT testicolo normale = $0,20 \lambda$).

DISCUSSIONE

Il sistema classificativo WHO per gli animali domestici tende attualmente ad una semplificazione, intendendo con MB una neoplasia originante per definizione dal cervelletto, per distinguerlo dagli altri Tumori Neuroectodermici Primitivi (PNET) extracerebellari, che condividono con MB l'aspetto istomorfologico.

L'immunoreattività del MB descritto ricalca quella riportata in bibliografia; la positività per pancitocheratina può essere interpretata come capacità di differenziazione multipla di cellule totipotenti (Patt e Zimmer, 1992). La debole immunoreattività per CD117, riscontrata anche nei MB pediatrici (Chilton-MacNeill et al., 2004), suggerisce invece che la via di trasduzione del segnale attraverso l'attivazione del recettore tirosin-chinasi giochi un ruolo secondario nella trasformazione neoplastica.

L'AT, valutata con metodica biomolecolare TRAP, ha fornito evidenza di un possibile ruolo della telomerasi nella patogenesi dei PNET, come già suggerito nell'uomo (Didiano et al., 2004), in cui è stata ipotizzata una relazione tra AT (o il grado di espressione di h-TERT) e attività proliferativa nei tumori intracranici, fra i quali anche il MB (Cabuy et al., 2001). Nel caso descritto l'AT ha manifestato valori molto elevati, suggerendo che le cellule neoplastiche del MB utilizzino preferenzialmente la via telomerasica per sfuggire ai meccanismi di controllo del ciclo cellulare. In bibliografia è inoltre noto che ulteriori modificazioni che creano difetti nella via del recettore Sonic hedge hog, Smoothened receptor e Wnt- β catenina, sono implicate nella tumorigenesi del MB e nella associazione di MB con la sindromi di Gorlin e di Turcot (Gray et al., 2004).

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

Cabuy E, De Ridder L: Telomerase activity and expression of telomerase reverse transcriptase correlated with cell proliferation in meningiomas and malignant brain tumors in vivo. *Virchows-Arch* 439: 176-184, 2001.

Chilton-MacNeill S, Ho M, Hawkins C, Gassas A, Zielenska M, Baruchel S: c-kit expression and mutational analysis in medulloblastoma. *Pediatr devel pathol.* 7, 493-498, 2004.

Didiano D, Shalaby T, Lang D, Grotzer MA: Telomere maintenance in childhood primitive neuroectodermal brain tumors. *Neuro-oncol* 6: 1-8, 2004.

Gray F, De Girolami, Poirier J: Escourolle & Poirier Manual of Basic Neuropathology. 4th ed., Butterworth Heinemann, Elsevier, Philadelphia, 2004.

Patt S, Zimmer C: Age-related immunoreactivity pattern in medulloblastoma. *Childs Nerv Syst* 8: 326-331, 1992.

Steinberg H, Galbreath EJ: Cerebellar medulloblastoma with multiple differentiation in a dog. *Vet Pathol.* 35:543-546, 1998.

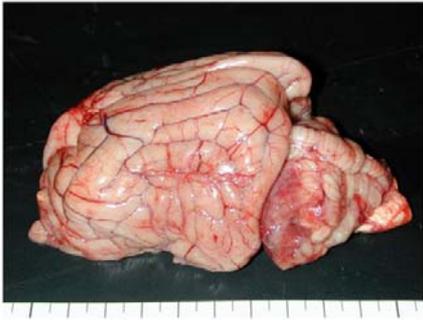


Figura 1. Cane, boxer. SNC.
 In corso di necropsia, l'esame macroscopico del sistema nervoso centrale ha evidenziato una massa gelatinosa rosa chiaro, debordante l'emisfero cerebellare sinistro.

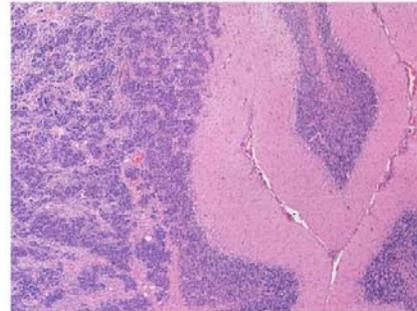


Figura 2. Cane, boxer. Cervelletto.
 L'esame istologico ha rivelato un tessuto neoplastico originato dallo strato esterno dei granuli, costituito da numerosi nidi di cellule poligonali fittamente stipate ("small blue cells") che tendono ad invadere le leptomeningi e gli spazi di Virchow-Robin, cui è frammista una popolazione minoritaria di cellule fusate e stellate.

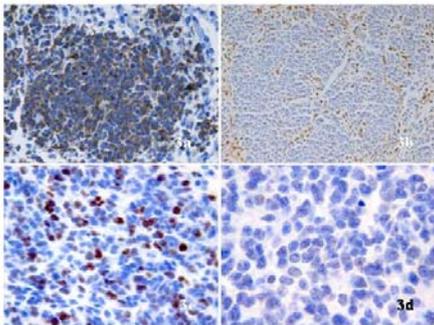


Figura 3. Cane, boxer. Cervelletto.
 L'immunoreattività per marcatori neuronali quali sinaptofisina (Fig 3a) ed NSE conferma l'origine cerebellare del MB, mostrando inoltre una tendenza alla differenziazione gliale (GFAP++) (Fig 3b). Le tipiche "small blue cells" esprimono inoltre vimentina (+++), CD117 (+) e citocheratina AE1/AE3 (+). Si apprezza una intensa attività proliferativa (MIB1 ++)(Fig 3c) ed un moderato segnale positivo per h-TERT (+) "speckled" nelle attese localizzazioni nucleolare e nucleare (Fig 3d).



VESTIBULAR SYNDROME IN A BOXER WITH CEREBELLAR MEDULLOBLASTOMA

A 4-year-old male Boxer was referred for progressive ataxia, nystagmus and head tilt, unresponsive to antibiotic and steroid therapies. Neurologic examination revealed a central vestibular syndrome. Computed-tomography imaging showed a intraxial mass in the left cerebellar hemisphere. The dog was euthanized and post-mortem revealed a pinkish gelatinous mass in the left cerebellar hemisphere, expanding and effacing the flocculonodular lobe, and displacing the fourth ventricle. Histology revealed a infiltrative tissue originating from the outer granular layer of cerebellum, composed of numerous nests of closely packed polygonal “small blue cells” that extended into the leptomeninges and filled the Virchow-Robin spaces. A population of spindle and stellate cells interspersed between cell nests was also evident. Immunohistochemistry (IHC) against tissue markers (NSE, NFP, S100, GFAP, synaptophysin, vimentin, CD3, CD79, CD117, cytokeratin AE1/AE3), cell cycle antigens (Ki67) and cell cycle checkpoints (p53, bcl-2, telomerase reverse transcriptase catalytic subunit) confirmed the neuronal origin of MB with a glial differentiation. Telomerase activity was also assessed by a PCR-ELISA technique and prompted extremely high levels, suggesting this as a possible pathway used by MB cells to escape cell cycle control.

Key words: dog, medulloblastoma, immunohistochemistry, telomerase activity



INDAGINI IMMUNOISTOCHEMICHE SU UN TUMORE PRIMARIO PROSTATICO A CELLULE FUSATE IN UN CANE

Millanta F., Vannozi I.*, Bandinelli P.,** Lorenzi D., Poli A.

*Dipartimento di Patologia Animale e *Dipartimento di Clinica Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Pisa; **Libero Professionista, San Casciano (FI)*

I tumori della primari della prostata sono rari nel cane ed originano prevalentemente dall'epitelio ghiandolare. L'incidenza di tumori mesenchimali è ancora più bassa e sono segnalati prevalentemente fibrosarcomi, leiomiomasarcomi, emangiosarcomi e linfo sarcomi. In questo studio descriviamo le caratteristiche ecografiche, istologiche ed immunoistochimiche di una massa prostatica in un cane. Il soggetto presentava sintomatologia aspecifica di patologia da aumento di volume prostatico, con perdita di peso e modesta difficoltà alla defecazione, nessuna difficoltà ad urinare. L'indagine ecografia rilevava un'area irregolare, non simmetrica, ipoecogena, con margini netti e non cistica, localizzata a livello prostatico dorsale. All'indagine istologica è stata evidenziata una proliferazione delimitata di cellule fusate organizzate in compatti fasci intrecciati. Le cellule mostravano minimi segni di atipia, citoplasma eosinofilo e nuclei ipercromatici, focalmente "a sigaro". Non si rilevavano mitosi. E' stata effettuata un'indagine immunoistochimica con anticorpi anti-citocheratine, anti-vimentina, anti α -Smooth Muscle Actin (SMA), anti-desmina ed anti-S-100, anti recettore per androgeni ed anti-MIB-1. Le cellule neoplastiche sono risultate negative alle citocheratine ed intensamente positive alla vimentina ed α -SMA. E' stata inoltre osservata una immunoreattività variabile alla desmina. La neoplasia è inoltre risultata S-100 negativa. E' stata formulata una diagnosi di leiomioma. La nostra è una delle rare segnalazioni di neoplasia mesenchimale primaria prostatica (leiomioma) nel cane.

Parole chiave: prostata, tumori mesenchimali, immunoistochimica, cane

IMMUNOHISTOCHEMICAL EVALUATION OF A PRIMARY PROSTATIC SPINDLE CELL TUMOUR IN A DOG

Primary neoplasms of the prostate gland are uncommon in the canine species and arise from the glandular epithelium. Mesenchymal tumours of the prostate have a much lower incidence and include fibrosarcomas, leiomyosarcomas, hemangiosarcomas, and lymphosarcomas. Here we describe the ecographic, histologic and immunohistochemical features of a prostatic nodule from a dog. The presenting symptoms of the dog included weight loss, and moderate straining to defecate. An increased volume of the prostate was detected by trans-rectal examination. Abdominal ultrasonography revealed a non-symmetric enlargement of the gland due to a hypoecogenic, delimited, non cystic, dorsal prostatic mass. Histological examination showed a demarcated proliferation of densely packed spindle cells, arranged in interlacing fascicles. The cells showed minimal atypia, eosinophilic cytoplasm and hyperchromatic, focally cigar shaped nuclei. Mitoses were not observed. An immunohistochemical characterization of the neoplasm by the use of anti-cytokeratins, anti-vimentin, anti- α -Smooth Muscle Actin, anti-desmin, anti S-100, anti androgen receptor, and anti-MIB-1 was performed. The cells were diffusely cytokeratin-negative, and strongly immunoreactive to the anti α -Smooth Muscle Actin antibody. The tumor cells were also variably desmin-positive. A diagnosis of primary leiomyoma was made. This is one of the rare cases of primary canine mesenchymal tumor (leiomyoma) of the prostate.

Key words: prostate, mesenchymal tumors, immunoistochemistry, dog



ANGIOENDOTELIOMATOSI REATTIVA SISTEMICA FELINA (FSRA)

Pezzolato Marzia, Varello Katia, Borlatto Laura, Iulini Barbara, Avallone Giancarlo*, Bozzetta Elena

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta - Area Neuroscienze e Genetica-
Laboratorio di Immunoistopatologia, Via Bologna 148, 10154 Torino, Italy*

**Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanita' Pubblica-Sezione Anatomia Patologica e Patologia
Aviare, Facolta' di Medicina Veterinaria, Via Celoria 10, 20133 Milano, Italy*

Il termine angioendoteliomatosi è stato usato, in passato, per descrivere diversi disordini proliferativi intravasali dell'uomo. Nel gatto i disordini proliferativi intravascolari sono stati recentemente classificati o come linfoma angiotropico o come angioendoteliomatosi reattiva sistemica felina (FSRA) e rappresentano entrambi patologie multisistemiche e fatali. Nel presente lavoro descriviamo un caso di FSRA identificato in Italia nel 2006.

Un gatto europeo di 8 anni maschio, cachettico, è stato condotto a visita ma, in seguito ad una lieve sedazione, in fase di risveglio ha presentato una progressiva insufficienza respiratoria a cui è seguito il decesso dell'animale.

L'esame necroscopico ha permesso di evidenziare una ipertrofia ventricolare sinistra con edema del sacco pericardio, essudato pericardico sierofibrinoso, degenerazione epatica e renale. Sono stati inoltre prelevati i seguenti organi da sottoporre ad esame istologico: sistema nervoso centrale, cuore, polmone, fegato e rene.

L'esame microscopico a livello di SNC, rene e cuore ha evidenziato lesioni simili, caratterizzate da una proliferazione intraarteriolare di cellule allungate che riempivano da parzialmente a totalmente il lume vasale e da trombi fibrinosi multifocali. Le cellule proliferate, organizzate a nidi, erano caratterizzate da nuclei tondeggianti, scarso citoplasma eosinofilo e figure mitotiche assenti. La sola colorazione con ematossilina ed eosina non permetteva tuttavia di formulare una diagnosi differenziale tra il linfoma angiotropico intravascolare e la variante sistemica reattiva.

I preparati sono stati quindi sottoposti a colorazione immunoistochimica con Vimentina, CD3, CD79 α , Fattore VIII.

La negatività della popolazione proliferata al CD3 e CD79 α ha permesso di escludere la diagnosi di linfoma angiotropico, mentre la positività delle cellule proliferate alla Vimentina e al fattore VIII ha confermato l'origine endoteliale delle cellule proliferate.

L'FSRA è una patologia rara, ad eziologia non ancora chiara, caratterizzata da proliferazione intraluminale dell'endotelio e dei periciti. Nell'uomo non si conoscono lesioni multisistemiche simili anche se sono stati descritti disordini cutanei localizzati caratterizzati dalle stesse lesioni.

Parole chiave: gatto, Angioendoteliomatosi Reattiva Sistemica Felina

FELINE SYSTEMIC REACTIVE ANGIOENDOTHELIOMATOSIS IN A DOMESTIC SHORT HAIR CAT

Intravascular proliferation of cats has been described only as angiotrophic lymphoma or as feline systemic reactive angioendotheliomatosis. FSRA is a rare multisystemic disease characterized by intraarteriolar endothelial and pericytic proliferation. No similar multisystemic syndrome has been identified in humans, where only similar cutaneous disorders have been described.

This short communication describes a single case of FSRA identified in Italy in 2006.

At necropsy of a short hair cat, a left ventricular hypertrophy with oedema of the pericardial sac with serosanguineous and fibrinous pericardial effusion were found associated with liver and kidney degeneration. Microscopically, intraluminal proliferations of spindle cells associated with thrombi were identified in heart, kidney, and brain, while lung and liver were normal. Proliferating cells expressed vimentin and vWF but were negative for CD3 and CD79 α . Immunohistochemical results ruled out a diagnosis of angiotrophic lymphoma and confirmed a diagnosis of Feline Systemic Reactive Angioendotheliomatosis

Key words: cat, systemic disease, feline systemic reactive angioendotheliomatosis



INVAGINAMENTO INTESTINALE DIGIUNO – DIGIUNALE IN ASSOCIAZIONE A GAGLIONEURITE MIENTERICA IN UN VITELLO

Rondena Marco, Riccaboni Pietro, Pravettoni Davide*, Morandi Nicola*; Zani Davide*, Scandella Massimiliano*, Belloli Angelo*, Finazzi Mario

*Facoltà di Medicina Veterinaria – Polo di Lodi
Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria
* Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie*

L'invaginamento digiuno – digiunale è una patologia riscontrabile con relativa frequenza nel vitello, essa può avere diverse cause eziologiche, ma in generale disordini della peristalsi sono considerati alla base di tale patologia. La presente segnalazione riguarda un vitello di due mesi, femmina, di razza bruna alpina, giunto alla clinica dei ruminanti del polo universitario di Lodi dove è stata formulata la diagnosi di invaginamento digiuno – digiunale, ridotto chirurgicamente. Dopo pochi giorni di miglioramento clinico, l'animale è improvvisamente peggiorato in seguito ad un secondo, fatale, invaginamento digiuno – digiunale. A livello necroscopico tale invaginamento era posizionato tra due anse digiunali a circa 1,5 metri oralmente alla sede dell'invaginamento primario. Dai campioni intestinali prelevati per l'istologia, colorati con Ematossilina Eosina, PAS, e con anticorpi anti – Sinaptofisina, NSE, GFAP, CD3 e CD79 si evidenziava una diffusa degenerazione dei plessi neuronali mioenterici, con una lieve e diffusa ganglioneurite enterica ed una diffusa cromatolisi centrale, spesso associata a vacuolizzazione neuronale, necrosi neuronale, satellitosi e neuronofagia.

Degenerazioni e ganglioneuriti dei gangli mienterici sono riportate sia in letteratura umana che veterinaria ed in molti casi l'eziologia risulta incerta. Le ganglioneuriti sono associate talora a disautonomia enterica, talora a sindromi diarroiche. La particolarità del caso descritto è data dall'associazione della recidiva dell'invaginamento con la ganglioneurite enterica riscontrata, che lascia sospettare un ruolo di quest'ultima nello sviluppo di alterazioni della peristalsi e quindi dell'invaginamento.

Parole chiave: Vitello, ganglioneurite, invaginamento

JEJUNO – JEUNAL INTUSSUSCEPTION AND MYENTERIC GANGLIONITS IN A CALF

Jejuno – jejunal intussusception is reported in calf. Etiology is uncertain and causes of peristaltic disorders are potentially involved. In this report we describe clinico – pathological findings of a two month old brown swiss calf, referred to the clinica dei ruminanti of polo universiario di Lodi following severe enteric symptoms. A diangosis of jejuno – jeunal intussusception was made, and surgery was performed. Four days after surgery, clinical conditions rapidly deteriorated and calf dead. Necropsy revelead a second jejuno – jejunal intussusception, located 1.5 m orally to the former. Intestinal samples collected for histology, stained with routine histo – methods and with antibodies anti Synaptophysin, NSE, GFAP, CD3 and CD79 presented moderate to severe, diffuse myenteric ganglionitis, associated with neuronal central chromatolysis, neuronal loss, neuronophagia. Myenteric ganglionitis are described both in human beings and in several animal species and are cited as causes of peristaltic disorder that had been extensively described in the human and animals. In this case, we speculate that ganglionitis had a possible role in establishing of peristaltic disorders predisposing to the intussusception.

Key words : Calf, ganglionitis, intussusception



IL PROGETTO TRACENET

Paola Sartorelli, Cristina Lecchi, Fabrizio Cecilian, Paolo Moroni, Alba Miranda Ribera, Vario Bronzo, Giuliano Pisoni

Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Università di Milano, Via Caloria 10, 20133 Milano

Le esigenze

La tracciabilità dei prodotti alimentari assume un ruolo di primaria importanza in un contesto in cui la globalizzazione della produzione e del trasporto delle derrate alimentari ha reso molto difficile il controllo diretto dalla produzione al consumo. La tracciabilità molecolare rappresenta attualmente il sistema univoco che può essere utilizzato per tracciare la provenienza dei prodotti, utilizzando quindi sia marcatori molecolari (DNA) che proteici.

I partecipanti del progetto

Sono gruppi di ricerca appartenenti all'Università di Milano (Dipartimento di Patologia Animale), dell'Università della Sud Boemia, dell'Università autonoma di Barcellona (Dipartimento di genetica) e del Parco tecnologico Padano.

Gli obiettivi del progetto

- trasferire le informazioni sulla tracciabilità molecolare agli operatori
- scambio di informazioni e di competenze tra ricercatori del settore
- identificare priorità di ricerca e sviluppo di metodiche nell'ambito della produzione degli alimenti di origine animale
- identificare i punti deboli nell'attuale sistema di conoscenze sulla tracciabilità molecolare

Risultati attesi

Per quello che riguarda il settore "patologia":

- valutare se le proteine di fase acuta possono rappresentare un buon biomarker per la valutazione della qualità degli alimenti di origine animale (carne-latte)
- creare un database di SOP (Standard Operational Procedures) per la valutazione e la quantificazione delle proteine di fase acuta.

Parole chiave: tracciabilità, alimenti di origine animale, GMO

SURVEY FOR TECHNOLOGICAL NEEDS IN TRACEABILITY FOR FOOD SAFETY

The needs

The need for systems for tracing plant and animal products has increased in importance since the globalisation of food production and trade have made impossible the direct control of food production by consumers. DNA and protein tracing offers a valid alternative, since both are permanent and not-alterable individual specific labels. The opportunity to adopt large-scale individual animal traceability programmes through DNA and protein markers is under evaluation in several EU Countries

The Participants

Fondazione Parco Tecnologico Padano (FPTP), Lombardy

University of South Bohemia (USB), South Bohemia

Università degli studi di Milano (UNIMI), Lombardy

Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Catalonia

General Objectives

- To provide agro-food operators opportunities for know-how exchange with special attention to SMEs;
- To support a flow of information and knowledge between in-field operators (e.g. breeders) and scientific researchers;
- To stimulate cooperation among SMEs providing the operators of the regions involved in the present project with the opportunity to meet and share experiences with regard to investment opportunities.



Specific Objectives

- To identify scientific research priorities in the agro-food and livestock fields in each participant Region
- To identify weak points in the current system of know-how transfer and communication in the agro-food and livestock sectors
- To identify educational needs for breeders, vets and other key figures involved in the agro-food chain in the Partner Regions

Expected Results

- Exchange of knowledge for assessing the bovine and small ruminants milk quality by measuring some specific protein biomarkers contents to assess the possible origin from unhealthy foodstuff or meat from diseased animals.
- Create a database of Standard Operation Procedures (SOP) covering utilization of molecular markers for the identification of food products and detection of GMO.



**BRONCOPOLMONITI PARASSITARIE DA *ANGIOSTRONGYLUS VASORUM* E
AELUROSTRONGYLUS ABSTRUSUS NEL CANE E NEL GATTO**

**Scaramozzino Paola, Eleni Claudia, De Liberato Claudio, Mastromattei Antonio, Terracciano
Giuliana, Scholl Francesco**

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana. Via Appia Nuova 1411, 00178 Roma

Angiostrongylus vasorum ed *Aelurostrongylus abstrusus*, nematodi responsabili di broncopolmoniti rispettivamente nel cane e nel gatto, risultano raramente segnalati in Italia.

Nel corso dell'attività diagnostica anatomopatologica presso la Sede di Roma dell'IZS Lazio e Toscana, nel periodo 2005 – 2007 sono stati diagnosticati 4 casi di angiostrongilosi nel cane e 4 casi di aelurostrongilosi nel gatto. La diagnosi è stata effettuata tramite evidenziazione delle larve e/o dei parassiti adulti nell'essudato broncopolmonare e nei preparati istologici.

I quadri anatomopatologici riscontrati nei cani erano caratterizzati da vaste aree di polmonite a diversi stadi evolutivi, ispessimento pleurico e versamenti sieroemorragici in cavità pleurica e pericardica. Nei gatti si evidenziavano lesioni polmonari analoghe. I quadri istologici erano caratterizzati da flogosi granulomatosa con al centro larve e uova, e presenza di parassiti adulti nelle arteriole polmonari nel cane e nei bronchioli nel gatto. In un caso di angiostrongilosi canina era evidente una disseminazione sistemica delle larve.

Parole chiave: Angiostrongylus, Aelurostrongylus, polmonite, cane, gatto.

INTRODUZIONE

Ogni anno pervengono all'IZS LT di Roma circa 200 cani e 80 gatti di proprietà o provenienti da strutture di ricovero per accertare la causa di morte. In minima parte si tratta di soggetti a vita libera (cani randagi e colonie feline) rinvenuti morti, nella maggioranza dei casi sono animali di proprietà di cui i proprietari richiedono l'esame autoptico. Affezioni delle vie respiratorie profonde sono risultate essere causa di morte in non più del 2% dei casi ma costituiscono spesso reperto accessorio. Tra queste si annoverano le broncopolmoniti parassitarie che non vengono mai indicate come sospetto clinico dal veterinario richiedente, in quanto considerate rare e scarsamente patogene, quando non sono completamente sconosciute. Le segnalazioni bibliografiche sulle due parassitosi in Italia sono rare (1, 2, 3, 4, 5, 6). Il ciclo di *Angiostrongylus vasorum* si caratterizza per la localizzazione degli adulti nelle arteriole polmonari ed eliminazione delle larve attraverso le vie respiratorie dopo effrazione della parete alveolare, successiva deglutizione e passaggio nelle feci. *Aelurostrongylus abstrusus* si differenzia per la localizzazione degli adulti che è bronchiolare. Entrambi utilizzano gasteropodi terrestri come ospiti intermedi, che vengono poi ingeriti dai carnivori per il completamento del ciclo.

Scopo del presente lavoro è la descrizione delle lesioni macroscopiche e microscopiche dei casi di angiostrongilosi ed aelurostrongilosi riscontrati nell'ambito della diagnostica post-mortem di routine.

MATERIALI E METODI

Nel periodo 1 gennaio 2005- 28 febbraio 2007 sono state eseguite 431 necroscopie su cani e 183 su gatti.

In seguito al riscontro nel polmone di lesioni nodulari di aspetto emorragico e/o fibrotico si è proceduto al taglio e al prelievo per spremitura di essudato bronchiolare e sangue residuo dalle arteriole polmonari e alla fissazione in formalina tamponata al 10% di tessuto polmonare. L'essudato e il sangue sono stati osservati ad occhio nudo per la ricerca dei parassiti adulti e al microscopio ottico a 10X per l'evidenziazione delle larve. Larve ed adulti sono stati identificati in base a precedenti descrizioni (7).

I campioni fissati sono stati successivamente inclusi in paraffina, sezionati a 5 µm di spessore e colorati con ematossilina-eosina per l'osservazione al microscopio ottico.

Nei casi in cui si riscontravano lesioni significative in altri organi, questi venivano sottoposti ad esame istologico secondo la stessa procedura.

RISULTATI

Nel periodo di studio sono stati diagnosticati 4 casi di angiostrongilosi nel cane e 4 casi di aelurostrongilosi nel gatto (Tabella).

Specie	Razza	Età	Sesso	Comune provenienza	di Proprietà /rifugio/ randagio	Parassitosi come causa determinante di morte
Cane	Meticcio	3 a e 1/2	M	Roma	Proprietà	si
Cane	Pinscher	9 mesi	M	Roma	Proprietà	si
Cane	Meticcio	1 anno	F	Roma	Randagio	si
Cane	Boxer	9 mesi	F	Castelgandolfo (RM)	Proprietà	si
Gatto	Europeo	5 anni	M	Trevignano (RM)	Proprietà	no
Gatto	Europeo	8 anni	F	Massa	Proprietà	si
Gatto	Europeo	7 anni	M	Viareggio (LU)	Gattile	si
Gatto	Europeo	7 anni	M	Tivoli (RM)	Colonia felina	si

Tabella. Casi di angiostrongilosi ed aelurostrongilosi diagnosticati presso l'IZS LT nel periodo 2005-2007.

Nei cani i polmoni si presentavano ingrossati, con noduli confluenti di 1-2 mm fino ad alcuni cm di diametro, di consistenza aumentata e di colore rosso-bruno o grigio in relazione al grado di cronicizzazione delle lesioni (Figura 1). Erano inoltre presenti abbondanti versamenti sieromorragici pleurici e pericardici. Il quadro istologico era caratterizzato da aree di flogosi granulomatosa, con presenza di numerose larve ed uova del parassita al centro, ed infiltrato, prevalentemente costituito da macrofagi, linfociti ed eosinofili, alla periferia. Erano inoltre evidenti cellule giganti, iperplasia delle ghiandole peribronchiali e fibrosi dei setti interalveolari. All'interno delle arteriole polmonari si rinvenivano i parassiti adulti (Figura 2).

Nel caso del boxer (vedi tabella) erano presenti gravi lesioni anche sugli altri organi, in particolare il miocardio interessato da numerose aree di aspetto necrotico, l'encefalo con emorragie diffuse ed i reni che mostravano segni di nefropatia cronica. In tali organi, come pure nel fegato e nei linfonodi mediastinici, si rinvenivano, all'osservazione dei preparati istologici, le larve all'interno dei capillari o nel parenchima, circondate da reazioni granulomatose (Figura 3 e 4).

Nei gatti le lesioni erano analoghe a quanto riscontrato nel cane (Figura 5), ad eccezione della localizzazione in sede bronchiolare dei parassiti adulti e degli aspetti, talora imponenti, di iperplasia-ipertrafia del tessuto muscolare liscio dei setti interalveolari, della parete delle arteriole e dei bronchioli.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

L'angiostrongilosi canina è considerata endemica in Francia ed in altri Paesi europei, quali Danimarca ed Inghilterra meridionale (8).

In Italia l'unico studio di prevalenza è stato effettuato sulla volpe ed ha rilevato un'elevata diffusione di *A. vasorum* in questa specie (3), ma non sono state mai effettuate indagini epidemiologiche nella popolazione canina, nonostante risultino sporadiche segnalazioni cliniche (5). Molto probabilmente nel nostro territorio, in analogia con quanto riscontrato in altri Paesi europei (8), l'angiostrongilosi canina costituisce un epifenomeno rispetto alla normale nicchia ecologica costituita dal ciclo "gasteropodi, volpe", come confermato anche dal riscontro casuale di positività in una volpe esaminata presso l'IZS di Roma nel periodo del presente studio (dati non pubblicati).

Le lesioni osservate risultano in accordo con quanto riportato in letteratura (9, 4, 10, 11) e consistono essenzialmente in una polmonite sub-acute con compromissione del microcircolo e della funzionalità respiratoria.

A differenza di quanto si verifica nelle volpi, che apparentemente non manifestano grave sintomatologia, nei cani l'angiostrongilosi può provocare quadri gravi di insufficienza cardio-respiratoria, arrivando perfino a causarne la morte. Inoltre, in uno dei casi presentati, la diffusione delle forme parassitarie risultava sistemica, in accordo con quanto già descritto da alcuni Autori (9, 12); mentre altri hanno segnalato localizzazioni ectopiche peculiari, specialmente a carico dall'occhio e del SNC (13, 14, 15).

L'aelurostrongilosi del gatto è stata già segnalata in Italia, anche su gatti vivi e di proprietà (1, 6). Riguardo l'età, nei casi riportati si trattava sempre di animali adulti, che probabilmente convivevano con la parassitosi da mesi o addirittura anni. Questo dato, in contrasto con quanto precedentemente riportato (11), potrebbe essere spiegato da un fenomeno di accumulo dovuto in parte alla scarsa patogenicità dei parassiti ed in parte all'inefficienza di sistemi immunitari tipo "self-cure", in analogia con quanto avviene negli ovini affetti da protostrongilidosi (16).

Per entrambe le parassitosi, la modalità peculiare di trasmissione delle forme infettanti, tramite ingestione di gasteropodi parassitati, indurrebbe a ritenere gli animali a vita libera maggiormente esposti. In realtà nei casi presentati nel presente studio la maggior parte degli animali era di origine domestica, anche se

tale dato necessiterebbe di conferme su un campione di popolazione maggiormente rappresentativo.

Evidentemente la frequentazione di ambienti esterni, anche per animali urbani e di proprietà, con alimentazione controllata, è già sufficiente per esporli al rischio di contagio (17). L'aumento delle volpi, ritenute serbatoio di malattia, potrebbe costituire un ulteriore fattore di rischio.

Il sospetto che queste parassitosi siano poco conosciute dai veterinari clinici, quindi sottovalutate, è avvalorato dal fatto che nessun animale è mai arrivato in Istituto con specifico sospetto anamnestico di broncopolmonite parassitaria.

Alla luce di quanto emerso sarebbe auspicabile che i veterinari considerassero le broncopolmoniti parassitarie nel cane e nel gatto tra le possibili cause di patologie respiratorie e circolatorie afebrili, resistenti agli antibiotici. In questi casi un semplice e specifico esame delle feci con metodo di Baermann per la ricerca delle larve, potrebbe, sia nel cane, sia nel gatto, permettere la diagnosi, ed in caso di negatività, dovrebbe essere ripetuto per almeno tre volte.

Anche la diagnosi anatomopatologica risulta particolarmente facile e veloce, purché si esegua uno striscio dall'essudato polmonare in corrispondenza delle lesioni di tipo emorragico o fibrotico, indipendentemente dalla presenza visibile a occhio nudo dei parassiti adulti.

In conclusione si ritiene necessario considerare l'angiostrongilosi e l'aelurostrongilosi nelle diagnosi differenziali in tutti i casi di broncopolmoniti croniche refrattarie agli antibiotici

BIBLIOGRAFIA

- 1) Canestri-Trotti G, Corradini L, Visconti S (1990). Indagine parassitologia in un rifugio per gatti a Ferrara. *Parasitology*, 32 (Suppl. 1), 42-43.
- 2) Pampiglione S, Canestri-Trotti G, Rivasi F (1990). L'aelurostrongilosi del gatto: 2 nuovi casi in Italia. *Parasitology*, 32 (Suppl. 1), 191-193.
- 3) Poli A, Arispici M, Mancianti F, Abramo F (1991). Pathology of naturally acquired *Angiostrongylus vasorum* infection in the red fox (*Vulpes vulpes*). *Angew Parasitol* 32, 121-126.
- 4) Pennisi MG, Niutta PP, Giannetto S (1994) *Parásitos pulmonares en el gato (Aelurostrongylus abstrusus)*. *Med Vet*, 11 (10) 568-572.
- 5) Della Santa D, Citi S, Marchetti V, Tardoni S (2002). Ingestione da *Angiostrongylus vasorum* nel

cane: review della letteratura e presentazione di un caso clinico. *Veterinaria* 16 (2) 9-14.

6) Grandi G, Calvi LE, Venco L, Paratici C, Genchi C, Memmi D, Kramer LH (2005). *Aelurostrongylus abstrusus* (cat lungworm) infection in five cats from Italy. *Vet Parasitol* 134, 177-182.

7) Guilhon J, Cens B (1973). *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866). Biological and morphological study. *Ann Parasitol Hum Comp* 48, 567-596 .

8) Bolt G, Monrad J, Koch J, Jensen AL (1994). Canine angiostrongylosis: a review. *Vet Rec*, 135, 447-452.

9) Perry AW, Hertling R, Kennedy MJ (1991). Angiostrongylosis with disseminated larval infection associated with signs of ocular and nervous disease in an imported dog. *Can Vet J*, 32, 430-431.

10) Bourque A, Conboy G, Miller L, Whitney H, Ralhan S (2002). *Angiostrongylus vasorum* infection in 2 dogs from Newfoundland. *Can Vet J*, 43, 876-879.

11) Headley SA (2005). *Aelurostrongylus abstrusus* induced pneumonia in cats: pathological and epidemiological findings of 38 cases (1987-1996). *Ciências Agrárias, Londrina*, 26, 3, 373-380.

12) Oliveira-Junior SD, Barcante JMP, Barcante TA, Ribeiro VM, Lima WS (2004). Ectopic location of adult worms and first-stage larvae of *Angiostrongylus vasorum* in an infected dog. *Vet Parasitol*, 121, 293-296.

13) Rosenlund P, Boserup F, Monrad J (1991). *Angiostrongylus vasorum* in the anterior chamber of the eye in dogs. *Dansk Veterinær Tidsskrift*, 12, 451-453.

14) Garosi LS, Platt SR, McConnel JF, Wray JD, Smith KC (2005). Intracranial haemorrhage associated with *Angiostrongylus vasorum* infection in three dogs. *J Small Anim Pract*, 46, 93-99.

15) Wessmann A, Lu D, Lamb CR, Smyth B, Mantis P, Chandler K, Boag A, Cherubini GB, Cappello R (2006). Brain and spinal cord haemorrhages associated with *Angiostrongylus vasorum* infection in four dogs. *Vet Rec*, 158, 858-863.

16) Urquhart GM, Armour J, Duncan JL, Dunn AM, Jennings FW (1996). *Veterinary Parasitology*, 2nd ed., Blackwell Science, 59-60.

17) Chapman PS, Boag AK, Guitian J, Boswood A (2004). *Angiostrongylus vasorum* infection in 23 dogs (1999-2002). *J Small Anim Pract*, 45, 435-440.



Figura 1. Cane. Angiostrongilosi. Presenza di aree di consistenza aumentata e di colore rosso-bruno.

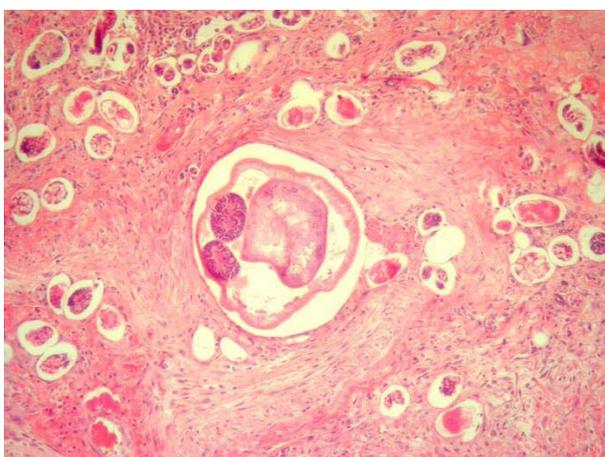


Figura 2. Cane. Polmone. Uova e larve di *Angiostrongylus vasorum* con presenza di un adulto in un'arteriola polmonare. E-E, Ob 10x.

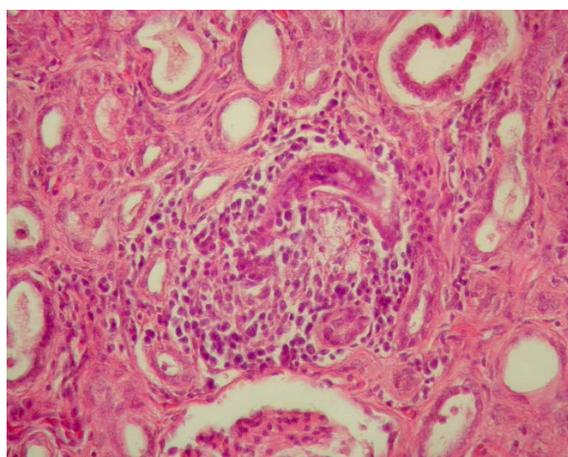


Figura 3. Cane. Rene. Granuloma con larva di *Angiostrongylus vasorum*. E-E, Ob 20x.

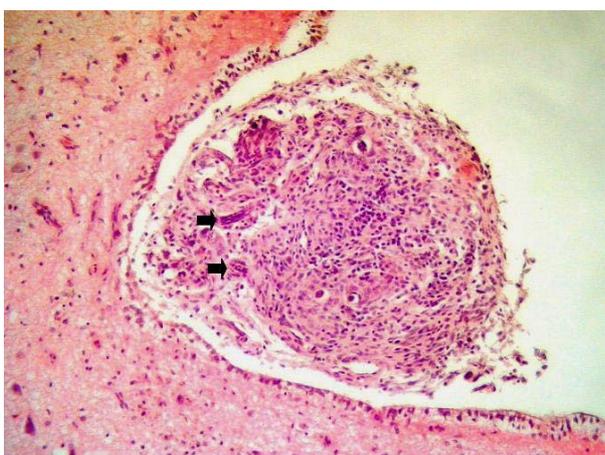


Figura 4. Cane. Encefalo. Granuloma con larve di *Angiostrongylus vasorum*. E-E, Ob 10x.

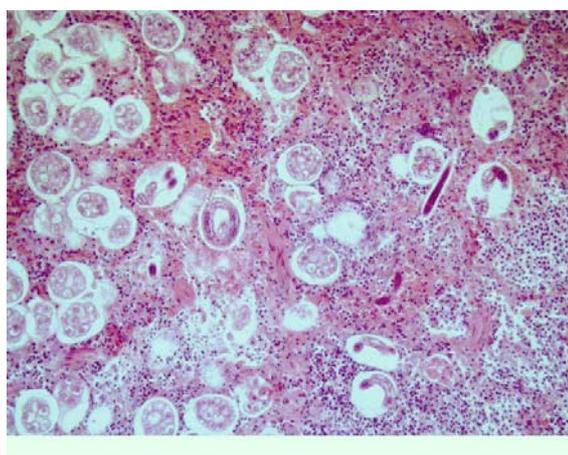


Figura 5. Gatto. Polmone. Uova e larve di *Aelurostrongylus abstrusus*. E-E, Ob 10x.

**PARASITIC BRONCHOPNEUMONIA BY *ANGIOSTRONGYLUS VASORUM* AND
AELUROSTRONGYLUS ABSTRUSUS IN DOGS AND CATS**

Angiostrongylus vasorum and *Aelurostrongylus abstrusus* are rarely reported in Italy. During 2005-2007, 4 cases of angiostrongylosis and 4 cases of aelurostrongylosis were diagnosticated in the post-mortem examination at the IZS Lazio e Toscana respectively in dogs and cats. Diagnosis was performed by direct observation of parasite larvae in fresh smears of bronchiolar exudate and in histological sections. In all the dogs bronchopneumonia at different evolution stages was observed. Similar lesions were observed in cats. In the histological sections adult parasites in proper locations were observed, associated to granulomatous inflammation. One case of angiostrongylosis was characterized by systemic larvae dissemination.

Key words: Angiostrongylus, Aelurostrongylus, pneumonia, dog, cat.

OSTEOSARCOMA DEL CANE. STUDIO ISTOLOGICO ED IMMUNOISTOCHEMICO DI 45 CASI

Scarpa Filippo, Bettini Giuliano, Cesari Alessandro

*Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria,
Università di Bologna*

E' stata condotta una indagine retrospettiva su 45 campioni di osteosarcoma (OS) di cane con l'obiettivo di classificarli in base al tipo istologico e di valutare il grado istologico e il possibile ruolo dell'immunoistochimica nella definizione diagnostica e prognostica.

La composizione della casistica ricalca i dati della letteratura scientifica: maggiore frequenza degli OS appendicolare rispetto agli assiali (80% vs 20%) e maggiore rappresentazione fra i primi delle localizzazioni agli arti anteriori rispetto ai posteriori (72,2% vs 27,8%) e di cani di taglia grande e gigante. L'istotipo più rappresentato e' risultato l'osteoblastico (66,7%) mentre gli altri istotipi sono stati osservati più raramente (fibroblastico 11,1%; a cellule giganti 8,9%; poco differenziato 6,7%; condroblastico 4,4%; teleangectasico 2,2%). Il grading istologico (che considera pleomorfismo nucleare, numero di mitosi e quantità di necrosi intratumorale) ha evidenziato la presenza dei gradi più alti (grado I: 28,2%; grado II: 41%; grado III: 30,8%) e non ha mostrato una evidente correlazione con l'istotipo.

Le prove immunoistochimiche oltre alla costante ed intensa espressione della vimentina hanno evidenziato in una rilevante percentuale di casi (76,9%) una inaspettata positività per l'actina da moderata ad intensa nel citoplasma delle cellule di OS non rapportabile all'istotipo o al grado istologico. L'attività proliferativa (AP), rilevata tramite valutazione analitica della percentuale di cellule positive per l'antigene nucleare Ki67 (anticorpo MIB1) è risultata molto eterogenea nell'ambito della casistica (range 0,4 – 60%) e significativamente correlata al numero di mitosi ed al grado istologico, ma non al grado di pleomorfismo nucleare, alla quantità di cellule necrotiche e al grado di espressione citoplasmatica di actina. Negli OS assiali l'AP è risultata mediamente più elevata rispetto agli appendicolari.

Parole chiave: osteosarcoma, cane, grading istologico, immunoistochimica , attività proliferativa.

INTRODUZIONE

L'osteosarcoma (OS) rappresenta l'85% dei tumori ossei primitivi del cane. Colpisce più spesso cani maschi di circa 7-8 anni, preferibilmente appartenenti a razze di taglia grande e gigante.

La localizzazione preferenziale è a livello di midollare metafisaria delle ossa dello scheletro appendicolare con predilezione per gli arti anteriori (soprattutto estremità distale del radio e prossimale dell'omero); meno frequenti le localizzazioni a livello di scheletro assiale.

Per definizione l'osteosarcoma è un tumore maligno a cellule fusate in cui la popolazione cellulare neoplastica è in grado di produrre matrice osteoide, osso immaturo od entrambe. I caratteri istologici possono essere molto eterogenei, come testimoniato dai diversi istotipi in cui è classificato l'OS (osteoblastico produttivo e non produttivo, condroblastico, fibroblastico, poco differenziato, teleangectasico, a cellule giganti), che tuttavia non sarebbero associati a diversità nel comportamento biologico. Alcuni studi hanno invece evidenziato una certa potenzialità prognostica del grading istologico, che è basato su pleomorfismo nucleare, quantità di necrosi intratumorale e numero di mitosi.

E' stata condotta un'indagine retrospettiva su 45 campioni di osteosarcoma di cane con l'obiettivo di classificarli in base al tipo istologico, valutare il grado istologico ed il possibile contributo dell'immunoistochimica alla definizione diagnostica e prognostica.

MATERIALI E METODI

Sono stati selezionati dall'archivio del Servizio di Anatomia Patologica 45 campioni di OS di cane (tessuti fissati in formalina tamponata, decalcificati se necessario con EDTA o prodotti a base acida, inclusi in paraffina, sezionati a 4 µm e colorati con ematossilina-eosina) sui quali è stata condotta classificazione istopatologica secondo gli schemi OMS (Slayter et al., 1994) e, se di dimensioni adeguate, graduazione istologica secondo Straw et al. (1996) (tabella 1).

Mediante metodiche immunoistochimiche si è inoltre proceduto alla valutazione dell'espressione nei tessuti neoplastici di vimentina, actina e dell'antigene nucleare Ki67. A tale scopo sono state allestite ulteriori sezioni dello spessore di 4 µm, che sono state deparaffinate, reidratate e sottoposte a trattamento di inibizione delle perossidasi endogene (perossido di idrogeno 0,3% in metanolo per 30 minuti). Le sezioni sono poi state immerse in tampone citrato a pH 6 e poste in forno a microonde a 750 W per 2 cicli di 5 minuti per la

riesposizione antigenica. L'incubazione con gli anticorpi primari (vimentina 1:100, actina 1:100, MIB1 1:30) è stata condotta overnight a 4° C. Per la rivelazione della reazione è stato impiegato un kit commerciale (DAKO LSAB Kit peroxidase). Come cromogeno è stata impiegata la DAB (0,04% per 10 minuti) e come colorazione di contrasto ematossilina di Papanicolau. Dopo disidratazione in alcoli a diluizioni crescenti e passaggio in xilolo, i preparati sono stati montati in DPX.

L'immunoreattività è stata considerata positiva se presente a livello citoplasmatico per vimentina ed actina mentre a livello nucleare per MIB1. Nel caso dell'actina è stata effettuata una valutazione semiquantitativa della percentuale di cellule positive. In particolare la reazione è stata giudicata actina-score 0 (reazione negativa del controllo interno rappresentato dalla parete dei vasi), 1 (controllo interno positivo, tumore negativo), 2 (fino al 50% delle cellule neoplastiche positive,) o 3 (quasi tutte le cellule neoplastiche positive). La determinazione del numero di cellule positive al MIB1 è stata invece ottenuta attraverso un sistema di analisi automatica di immagine (Nikon LUCIA G). Il conteggio videoassistito ha considerato il numero dei nuclei positivi rispetto ai nuclei totali effettuato su 5 campi per ogni preparato istologico ad ingrandimento 20x. Il grado di positività è stato poi espresso in percentuale come MIB1 index.

Si è infine cercato di valutare l'esistenza di eventuali correlazioni tra localizzazione della neoplasia (OS assiale o appendicolare), istotipo, grado istologico, singoli parametri che entrano nella formulazione del grado istologico (numero di mitosi, pleomorfismo nucleare, quantità di necrosi intratumorale), immunoreattività all'actina e attività proliferativa (MIB1 index) utilizzando il test di Kruskal-Wallis.

RISULTATI

Dall'esame dei dati relativi al segnalamento dei 45 casi di OS si è osservata la seguente distribuzione razziale: Pastore tedesco (24,4%), Meticcio (16,3%), Dobermann (8,9%), Pastore maremmano, Terranova (6,7%), Alano, Boxer, Rottweiler, Setter (4,4%), Bovaro delle fiandre, Bulldog francese, Corso, Dalmata, Drahtar, Levriero russo, Maltese, Pastore belga, Pastore scozzese, San Bernardo (2,1%). L'età media riscontrata era di circa 8 anni, e i maschi (29/45; 64,4%) erano in numero superiore rispetto alle femmine (16/45; 35,6%), con un rapporto maschi:femmine di 1,8:1. Gli OS esaminati interessavano prevalentemente lo scheletro appendicolare (36/45; 80%) e più raramente quello

assiale (9/45; 20%); in particolare la neoplasia era localizzata soprattutto a livello di arti anteriori (72,2%; estremità distale del radio/prossimale dell'omero) rispetto ai posteriori (27,8%; estremità distale del femore/prossimale della tibia). Gli OS appendicolari riguardavano soprattutto cani di taglia medio/grande (77,8%) o gigante (22,2%), mentre gli OS assiali sono stati rilevati anche in cani di taglia media e piccola. L'età media dei cani con OS appendicolare era 7,9 anni, e 8,4 anni nei cani con OS assiale (ANOVA: $p=0,65$). L'istotipo più rappresentato è risultato l'osteoblastico (66,7%), mentre gli altri istotipi sono stati osservati più raramente (fibroblastico 11,1%; a cellule giganti 8,9%; poco differenziato 6,7%; condroblastico 4,4%; teleangectasico 2,2%). Non era apprezzabile alcun rapporto fra tipo istologico e localizzazione, in quanto sia negli OS assiali che in quelli appendicolari l'istotipo maggiormente rappresentato era quello osteoblastico (tabella 2).

Dei 39 OS in cui la sezione disponibile aveva dimensioni sufficienti a consentire un'adeguata valutazione dei parametri di grading istologico (tabella 1), 11 (28,2%) sono risultati di grado I, 16 (41%) di grado II e 12 (30,8%) di grado III. Gli OS appendicolari sono risultati per il 30% di grado I, per il 36,7% di grado II e per il 33,3% di grado III; per quanto riguarda invece gli OS assiali il 22,2% erano di grado I, il 55,5% di grado II e il 22,2% di grado III.

L'estrema prevalenza degli OS osteoblastici sugli altri istotipi non ha permesso di valutare statisticamente eventuali differenze nella distribuzione del grado istologico in rapporto al tipo istologico (tabella 3).

L'immunoistochimica ha evidenziato in tutti i casi una intensa positività citoplasmatica alla vimentina. In 30 casi su 39 (76,9%) si è anche rilevata una inaspettata positività immunoistochimica delle cellule neoplastiche all'actina, da moderata (actina-score 2: 28,2%) a intensa (actina-score 3: 48,7%), generalmente a focolaio nell'ambito della sezione. Di questi 30 casi, 20 (66,7%) erano OS osteoblastici, 4 (13,3%) a cellule giganti, 2 (6,7%) fibroblastici, 2 (6,7%) condroblastici, 1 (3,3%) teleangectasico ed 1 (3,3%) poco differenziato; in rapporto al grado istologico 10 (33,3%) erano di grado III, 13 di grado II (43,3%) e 7 di grado I (23,3%), senza apprezzabili differenze in rapporto alla localizzazione.

L'anticorpo MIB1 non ha mostrato alcuna reattività in 12 dei 39 osteosarcomi testati (30,8%). Nei 27 (69,2%) campioni reattivi era invece apprezzabile una positività nucleare molto eterogenea (MIB1 index variabile da 0,4 a 60%). Negli OS assiali l'AP è risultata mediamente più elevata rispetto agli appendicolari (28,63% vs 15,48%; $p=0,02$). Rispetto al tipo istologico, l'AP era pari al 20,3% in 17 OS

osteoblastici, 12,7% in 3 OS a cellule giganti, 8,4% in 2 OS poco differenziati, 17,2% in 2 OS fibroblastici 17,9% in 2 OS condroblastici e 27,4% in 1 OS teleangectasico ($p=0,7$). Nei 7 OS di grado I il MIB1-index era 9%, 19,7% negli 11 OS di grado II e 24,1% nei 9 OS di grado III ($p=0,01883$); quanto agli elementi morfologici che entrano nella formulazione del grading istologico, è stata rilevata una correlazione significativa del MIB1-index con la quantità di mitosi ($p=0,04371$) ma non con il grado di pleomorfismo nucleare e con la quantità di necrosi intratumorale ($p=0,05$). Infine, non era apprezzabile alcuna correlazione fra grado di immunopositività all'actina delle cellule neoplastiche e MIB1 index (actina-score 1: MIB1 index = 14,47%; actina-score 2: MIB1 index = 18,91%; actina-score 3: MIB1 index 19,18%; $p=0,5$).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La composizione della casistica ricalca i dati della letteratura scientifica: maggiore frequenza degli OS appendicolari rispetto agli assiali e maggiore rappresentazione fra i primi delle localizzazioni agli arti anteriori rispetto ai posteriori e di cani di taglia grande e gigante (Misdorp e Hart, 1979; Jongeward, 1985; Meuten, 2002). L'istotipo più rappresentato è risultato l'osteoblastico, mentre gli altri istotipi sono stati osservati più raramente. In merito alla classificazione istopatologica deve comunque essere segnalato che nell'ambito dello stesso campione è risultato estremamente frequente rilevare aree a diversa differenziazione, attribuibili pertanto ad istotipi differenti; negli studi che nella classificazione dell'OS canino comprendono anche l'istotipo combinato (in cui sono contemporaneamente presenti aree a diversa differenziazione), quest'ultimo risulta il pattern istologico più frequente (Misdorp e Hart, 1979; Kirpensteijn et al., 2002). Diverse ricerche hanno tuttavia evidenziato che a istotipi diversi non corrisponde un comportamento biologico diverso (Grundmann et al., 1995; Kirpensteijn et al., 2002), suggerendo di non considerare di fondamentale importanza la classificazione degli osteosarcomi in un istotipo o in un altro, quanto piuttosto di individuare altri elementi istologici maggiormente correlati alla prognosi; tra i parametri fino a oggi valutati il più promettente è il grading istologico, che si basa sulla valutazione di pleomorfismo nucleare, numero di mitosi e necrosi intratumorale (Straw et al., 1996; Kirpensteijn et al., 2002). Nella nostra casistica si è evidenziata una netta prevalenza dei gradi più alti, con rappresentazione di gradi di malignità diversi

nell'ambito dello stesso istotipo; è da segnalare, comunque, come già osservato da altri (Hammer et al., 1995; Misdorp e Hart, 1979), che l'OS telangectasico era di grado III, che i quattro OS fibroblastici erano di basso grado, e che gli OS a cellule giganti erano prevalentemente di alto grado.

Le prove immunoistochimiche, oltre alla costante ed intensa espressione della vimentina, hanno evidenziato in una rilevante percentuale di casi una inaspettata positività per l'actina nel citoplasma delle cellule di OS, non rapportabile all'istotipo o al grado istologico. Tale riscontro, che non risulta segnalato finora nella letteratura scientifica, potrebbe essere in linea teorica collegato all'acquisizione da parte delle cellule neoplastiche di capacità di movimento autonomo, come risultato dell'autoselezione di particolari cloni cellulari nell'ambito dei fenomeni di evoluzione della popolazione neoplastica. Tale ipotesi potrebbe essere supportata dall'osservazione che studi in vitro su linee cellulari di OS di topo hanno evidenziato un'associazione fra la espressione di actina e l'acquisizione del fenotipo di chemioresistenza multipla (MDR-multidrug resistance), suggerendo quindi una relazione fra l'aberrante espressione citoplasmatica di actina e un comportamento più aggressivo della neoplasia (Takeshita et al., 1998).

L'attività proliferativa (AP), rilevata tramite valutazione analitica della percentuale di cellule positive per l'antigene nucleare Ki67 con l'anticorpo MIB1 è risultata molto eterogenea nell'ambito della casistica e significativamente correlata al grado istologico, ma non all'istotipo; nell'ambito dei parametri utili alla formulazione del grading, l'AP è risultata direttamente correlata alla quantità di mitosi, e non al grado di pleomorfismo nucleare ed alla quantità di cellule necrotiche. L'assenza di correlazioni evidenti fra istotipo e AP conferma la scarsa importanza ai fini prognostici della classificazione in istotipi e la potenziale utilità del grading istologico, anche se fra gli aspetti morfologici valutati, solo la quantità di mitosi è effettivamente correlata all'AP. È tuttavia da sottolineare come l'applicazione del grading istologico negli OS sia estremamente soggettiva. Hasegawa (2007) ha suggerito che nella formulazione del grading istologico dei sarcomi dei tessuti molli dell'uomo la quantità di mitosi potrebbe essere utilmente sostituita dal MIB1-index che, anche se più indaginoso in termini di valutazione, fornirebbe una stima più oggettiva dell'effettiva percentuale di cellule in ciclo. È inoltre da sottolineare l'estrema soggettività della valutazione del grado di pleomorfismo nucleare, che allo stesso modo potrebbe essere sostituito o integrato da valutazioni morfometriche. Infine, la quantità di necrosi intratumorale osservata è dipendente dal

numero di sezioni osservate e dalla quantità di tessuto campionato, e quindi non necessariamente rappresentativa del reale rapporto fra tessuto sano e necrotico. Nella casistica esaminata gli OS assiali hanno mostrato un'AP significativamente più elevata rispetto agli OS appendicolari (32,24% vs 14,94%), nonostante per questi ultimi sia riferito un comportamento più aggressivo (Heyman et al., 1992; Meuten, 2002), il che pone qualche dubbio sulla effettiva rilevanza prognostica dell'AP negli OS del cane. Infine, non era apprezzabile alcuna correlazione fra positività all'actina degli OS e AP.

In conclusione, in questo studio è stato possibile confermare in una casistica di 45 OS di cane gli aspetti riferiti dalla letteratura corrente riguardo agli aspetti anatomoclinici ed istopatologici. I sistemi di valutazione prognostici in uso sono tuttavia risultati solo parzialmente coerenti fra loro, e ciò suggerisce la necessità di approfondire meglio i rapporti fra parametri istologici e comportamento biologico in casistiche in cui sia anche disponibile un adeguato follow-up; i nostri risultati suggeriscono di comprendere fra tali parametri anche la valutazione del grado di espressione dell'actina, che sulla base dei dati raccolti potrebbe rappresentare un fattore prognostico indipendente da grado istologico e attività proliferativa.

BIBLIOGRAFIA

1. Grundmann E., Roessner A., Ueda Y. et al. (1995) *Current aspect of the pathology of osteosarcoma*. Anticancer Res, 15:1023-1033.
2. Hammer A.S., Weeren F.R., Weisbrode S.E. et al. (1995) *Prognostic factors in dogs with osteosarcomas of the flat or irregular bones*. J Am Anim Hosp Assoc, 31: 321-326.
3. Hasegawa T. (2007) *Histological grading and MIB-1 labeling index of soft-tissue sarcomas*. Pathol Int, 57(3):121-5.
4. Heyman S.J., Diefenderfer D.L., Goldschmidt M.H. et al. (1992) *Canine axial skeletal osteosarcoma. A retrospective study of 116 cases (1986 to 1989)*. Vet Surg, 21(4):304-310.
5. Jongeward S.J. (1985) *Primary bone tumors*. The Vet Clin North Am Small Anim Pract, 15:609-641.
6. Kirpensteijn J., Kik M., Rutteman G.R., Teske. (2002) *Prognostic significance of a new histologic grading system for canine osteosarcoma*. Vet Pathol, 39: 240-246.
7. Loukopoulos P., Robinson W.F. (2007) *Clinicopathological relevance of tumour grading*

- in canine osteosarcoma*. Journal of comparative Pathology, 136: 65-73.
8. Marconato L. (2005) *Tumori dello scheletro*. In : Oncologia medica dei piccoli animali, Marconato L., Del Piero F., Paletto editore, Milano. Capitolo 19, pp. 355-379.
 9. Misdorp W., Hart A.A. (1979) *Some prognostic and epidemiologic factors in canine osteosarcoma*. J Natl Cancer Inst, 62:537-545.
 10. Ohta G., Sakai H., Kachi S. et al. (2004) *Assessment of proliferative potentials of canine osteosarcomas and chondrosarcomas by MIB-1 immunohistochemistry and bromodeoxyuridine incorporation*. Journal of comparative Pathology, 131:18-27.
 11. Slayter M.V., Boosinger T.R., Pool R.R. et al. (1994) *Histological Classification of Bone and Joint Tumors of Domestic Animals*. World Health Organization. II serie, vol. 1. Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, Washington, D.C.
 12. Straw R.D., Powers B.E., Klausner J. et al. (1996) *Canine Mandibular Osteosarcoma : 51 Cases (1980-1992)*. J Am Anim Hosp Assoc, 32:257-262.
 13. Takeshita H., Kasuzaki K., Ashihara T. et al. (1998) *Actin organization associated with the expression of multidrug resistant phenotype in osteosarcoma cells and the effect of actin depolymerization on drug resistance*. Cancer Letters, 126:75-81.
 14. Thompson K.G., Pool R.R. (2002) *Tumors of bones*. In : Tumors in domestic animals, Meuten D.J., IV edizione, Iowa State Press, Iowa. Capitolo 5, pp. 245-317.

Parametri istologici	Descrizione	Valore
<i>Pleomorfismo nucleare</i>	Nessuno	1
	Moderato	2
	Marcato	3
<i>Mitosi (n°/10 hpf 400x)</i>	1-10	1
	11-20	2
	21-30	3
	>30	4
<i>Quantità di tessuto necrotico (%)</i>	Assente	0
	<15%	1
	15-50%	2
	>50%	3

Grado istologico

Da 1 a 5 = Grado I

Da 6 a 7 = Grado II

Da 8 a 10 = Grado III

Tabella 1. Sistema di grading istologico dell'OS del cane (Straw et al., 1996).

Istotipo	Osteosarcomi appendicolari	Osteosarcomi assiali	Totale
<i>OS osteoblastico</i>	25 (69,4%)	5 (55,6%)	30 (66,7%)
<i>OS fibroblastico</i>	4 (11,1%)	1 (11,1%)	5 (11,1%)
<i>OS a cellule giganti</i>	3 (8,3%)	1 (11,1%)	4 (8,9%)
<i>OS poco differenziato</i>	2 (5,6%)	1 (11,1%)	3 (6,7%)
<i>OS condroblastico</i>	1 (2,8%)	1 (11,1%)	2 (4,4%)
<i>OS teleangectasico</i>	1 (2,8%)	-	1 (2,2%)

Tabella 2. Frequenza dei differenti istotipi nei casi di OS.

Istotipo	n° di casi	%
<i>OS osteoblastico</i>	25	64,1
Grado I	8	32
Grado II	10	40
Grado III	7	28
<i>OS fibroblastico</i>	4	10,3
Grado I	2	50
Grado II	2	50
Grado III	0	0
<i>OS a cellule giganti</i>	4	10,3
Grado I	1	25
Grado II	0	0
Grado III	3	75
<i>OS poco differenziato</i>	3	7,7
Grado I	0	0
Grado II	3	100
Grado III	0	0
<i>OS condroblastico</i>	2	5,1
Grado I	1	50
Grado II	1	50
Grado III	0	0
<i>OS teleangectasico</i>	1	2,6
Grado III	1	100
Totali	39	100,0

Tabella 3. Rapporto tra istotipo e grado istologico nei casi di OS

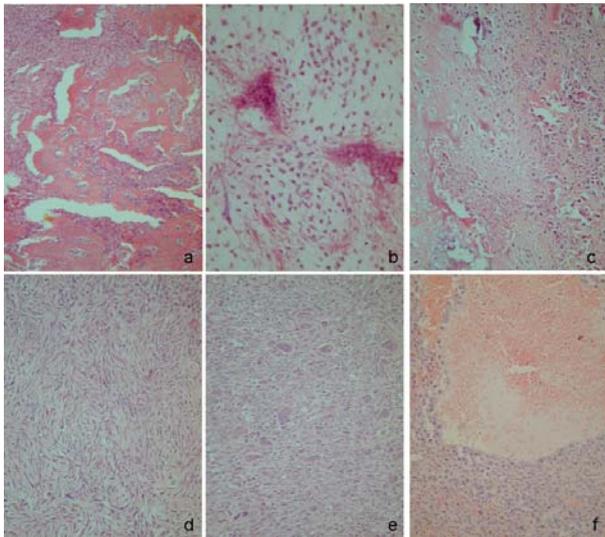


Figura 1. a) *OS osteoblastico*. Abbondante produzione di matrice osteoide da parte degli osteoblasti neoplastici. E.E.; b) *OS poco differenziato*. Osteoblasti neoplastici simili a cellule reticolari del midollo osseo che depongono osteoide. E.E.; c) *OS condroblastico*. Gli osteoblasti neoplastici producono sia matrice osteoide che condroide. E.E.; d) *OS fibroblastico*. Cellule fusate simili a quelle di fibrosarcoma, con scarsa tendenza alla deposizione di osteoide. E.E.; e) *OS a cellule giganti*. Presenza di numerose cellule giganti multinucleate. E.E.; f) *OS teleangectasico*. Le cellule sarcomatose delimitano lacune ripiene di sangue e occasionalmente producono sostanza osteoide. E.E.

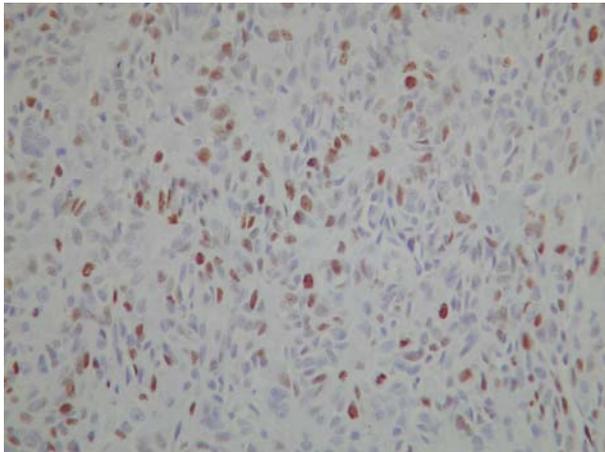


Figura 3. *OS osteoblastico*. Colorazione immunohistochimica con anticorpo MIB1. Positività nucleare intensa ed in un elevato numero di cellule.

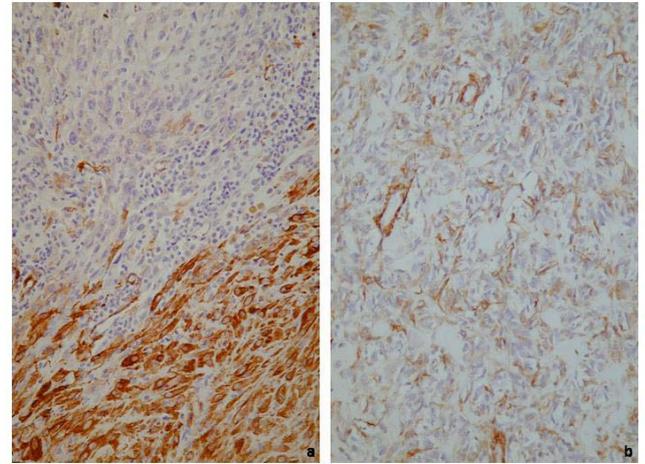


Figura 2. a) *OS osteoblastico*. Intensa espressione immunohistochimica di actina in parte delle cellule neoplastiche. Actina; b) *OS osteoblastico*. L'espressione di actina è limitata alla parete dei microvasi intratumorali. Actina.

CANINE OSTEOSARCOMA. HISTOLOGIC AND IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY OF 45 CASES

Forty-five canine osteosarcomas (OS) were histologically classified and graded, and an immunohistochemistry panel was applied. The composition of the studied OS population was comparable to that of previous studies: appendicular OS were more frequent than axial (80% vs 20%); within appendicular OS, forelimb location was prevalent (72.2% vs 27.8%), and large to giant breeds were mostly represented. Osteoblastic OS was the more frequent histotype (66.7%), followed by fibroblastic (11.1%), giant cells (8.9%), poorly differentiated (6.7%), chondroblastic (4.4%) and teleangectatic (2.2%). Histologic grading (featuring nuclear pleomorphism, number of mitoses and amount of intratumoral necrosis) prompted grade I in 28.2% of cases, grade II in 41% and grade III in 30.8%; there was no relation between histologic grade and histotype.

Immunohistochemistry, beside marked expression of vimentin in all cases, evidenced in several cases (76.9%) a moderate to strong cytoplasmic positivity to smooth muscle actin, not related to histotype or histologic grade. Proliferative activity (PA), assessed by the analytic evaluation of the percentage of cells expressing the nuclear antigen Ki67 (MIB1-index), was directly related to the number of mitoses and histologic grade, but not to nuclear pleomorphism, necrosis amount and actin expression. Axial OS displayed a PA higher than appendicular OS.

Key words: osteosarcoma, dog, histologic grading, immunohistochemistry, proliferative activity.

DIFFUSIONE DI PCV-2 NELLA POPOLAZIONE DI CINGHIALI (*Sus scrofa*) DELLE PROVINCE DI GROSSETO E PISA

Verin Ranieri, Ricci Martina, Taccini Ennio, Poli Alessandro

Dipartimento di Patologia Animale, Profilassi ed Igiene degli Alimenti. Viale delle Piagge 2, 56124 Pisa

Il circovirus suino tipo 2 (PCV-2) è un agente eziologico molto piccolo, a simmetria icosaedrica, privo di envelope e contenente DNA a singolo filamento circolarizzato. Il virus, ampiamente diffuso negli allevamenti suini di tutto il mondo, è causa di patologie respiratorie, riproduttive, nonché della sindrome da deperimento organico post-svezzamento (PMWS). La presenza del virus e le manifestazioni patologiche associate sono state dimostrate anche nel cinghiale. Questo lavoro si pone come obiettivo la raccolta di informazioni sulla prevalenza di PCV-2 e la caratterizzazione delle lesioni organiche nei cinghiali delle Province di Grosseto (n=52) e Pisa (n=92). Sono state condotte indagini istopatologiche ed istochimiche su vari organi per la caratterizzazione delle lesioni e di immunofluorescenza su tessuto linfoide per svelare la presenza dell'antigene virale di PCV-2. Sono state accertate lesioni a carico del tessuto polmonare, tonsillare e dei linfonodi. Lo studio ha rilevato una prevalenza per PCV-2 del 42% e del 13% rispettivamente nelle Province di Grosseto e Pisa. Nessuna differenza statistica è stata inoltre evidenziata tra i soggetti di sesso ed età diverse. In conclusione si dimostra il ruolo di serbatoio di PCV-2 che il cinghiale potrebbe rivestire nei confronti del suino rappresentando un pericolo, soprattutto per quegli esemplari allevati al brado con il quale può venire facilmente in contatto. Sono pertanto necessari studi più approfonditi per determinare il ruolo del cinghiale nell'epidemiologia di questa infezione virale.

Parole chiave: Circovirus, cinghiale, immunofluorescenza, tessuto linfoide

PCV-2 DIFFUSION IN THE WILD BOAR (*Sus scrofa*) POPULATION FROM THE PROVINCE OF GROSSETO AND PISA

The Porcine Circovirus type 2 (PCV-2) is a tiny etiologic agent with icosahedric symmetry, and without envelope containing single stranded, circular jointed, DNA. The virus, spread worldwide in the porcine breeding, is responsible for breathing, reproductive pathologies, and for the post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs (PMWS). The incidences of the virus and its pathological effects have been also demonstrated in the wild boar. The focus of this work is to investigate the prevalence of PCV-2 in wild boar populations from the provinces of Grosseto (n=52) and Pisa (n=92). Histopathological, and histochemical investigations were performed on several organs to detect the presence of lesions. The viral antigen was immunolocalized by direct immunofluorescence in lymphoid tissue. Lesions of the pulmonary, tonsillar tissues, and of the lymph-nodes have been verified. The study revealed PCV-2 positivity in 42% of the wild boars coming from the province of Grosseto, and in 13% of the subjects from the province of Pisa. No difference were moreover assessed between males and females or between different ages throughout statistical analysis. This study demonstrated that the wild boar could play a role as PCV-2 reservoir for the swine, especially for those animals bred in the wild, which can easily come in contact with these infected wild boars. Further studies are necessary to better evaluate the role of the wild boar in the epidemiology of this viral infection.

Key words: Circovirus, wild boar, immunofluorescence, lymphoid tissue