



ASSOCIAZIONE ITALIANA
DI PATOLOGIA VETERINARIA

AIPVet

ASSOCIAZIONE ITALIANA DI PATOLOGIA VETERINARIA

ATTI VII CONGRESSO NAZIONALE
ISSN 1825 - 2265



CASTELSARDO (SS)

17-18 Giugno 2010



**ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DELLA SARDEGNA**
"G. PEGREFFI"

Premio Ennio Sanna 2010

ESPRESSIONE DI miRNA IN MONOCITI BOVINI DOPO STIMOLAZIONE IN VITRO CON CHALLENGERS INFIAMMATORI.

Dilda F., Gioia G., Pisani L. F., Restelli L., Albonico F., Bronzo V., Mortarino M., Sartorelli P., Ceciliani F.

Premio Rosario Preziosi 2010

VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA DELL' ENZIMA 11 β -IDROSSISTEROIDE DEIDROGENASI 1 E 2 IN COLTURE DI ADIPOCITI BOVINI TRATTATI CON DESAMETASONE E PREDNISOLONE.

Uslenghi F., Divari S., Cannizzo F.T., Demaria R., Pregel P., Biolatti B.

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 a invito

In viaggio con i retrovirus tra evoluzione, fisiologia e patologia.

Palmarini Massimo

Adenocarcinoma (adenomatosi) polmonare ovino: un possibile modello per lo studio del carcinoma bronchioloalveolare nei carnivori domestici e nell'uomo.

Livesu Giovanni M., Cubeddu Tiziana, Rocca Stefano, Sechi Tiziana, Casu Sara, Sironi Giuseppe, Valenza Federico, Tanda Francesco, Christine Cousens, Leoni Antonio

Il laboratorio di analisi cliniche a supporto della sperimentazione animale. L'esempio della bluetongue.

Nicolussi Paola

Portale scientifico web (PSWeb): un nuovo strumento per la gestione, elaborazione e trasmissione di informazioni/dati/immagini.

Dondo Alessandro

La paratuberculosis: aspetti patogenetici, zoonosici e diagnostici.

Rocca Stefano, Cubeddu Tiziana, Farigu Serafina, Leoni Antonio

***Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* e malattie autoimmuni: possibile ruolo nel morbo di Crohn e nel diabete mellito di tipo 1.**

L. Sechi

Comunicazioni

RILIEVI POST-MORTEM IN UNO SPIAGGIAMENTO DI MASSA DI 7 CAPODOGLI (*Physeter macrocephalus*).

Mazzariol S., Petrella A., Troiano G., Zizzo N., Passantino G., Giurisato M., Marcer F., Mattiucci S., Nascetti G., Pavan G., Podestà M., Beraldo de Quiros M.Y., Marsili L., Fossi M. C., Ferrante M., Trincoli M., Pennelli M., Marruchella G., Di Guardo G.

DESCRIZIONE DI UN EPISODIO DI INFESTAZIONE DA *Sciadicleithrum variabilum* IN UN ALLEVAMENTO DI DISCUS (*Symphysodon discus*).

Gibelli L.R., Aquaro G., Salogni C., Galli P., Gelmetti D.

VALORI EMATOLOGICI E BIOCHIMICI IN RICCI (*Erinaceus europaeus*) DOPO RIABILITAZIONE PRESSO CENTRI DI RECUPERO.

Rossi G., Martino Volta N., Mangiagalli G., Paltrinieri S.

MALFORMAZIONI CARDIOVASCOLARI NEL VITELLO: CONTRIBUTO CASISTICO.

Binanti D., Morandi N., Rondena M., Pravettoni D., Riccaboni P.

RICERCA DI SANGUE OCCULTO NELLE FECI IN SUINI DI ALLEVAMENTO INTENSIVO COME INDICATORE DI ULCERA GASTROESOFAGEA.

Binanti D., Benedetti V., Rondena M., Vezzoli F., Riccaboni P.

ASPETTI ULTRAISTRUTTURALI DELL'ITTIOSI BOVINA: STUDIO PRELIMINARE.

Brachelente C., Lepri E., Sforza M., Mechelli L., Capuccini S.

ENTEROPATIA DA *Enterococcus* spp ASSOCIATA A SINDROME ALOPECICA IN CONIGLI LATTANTI.

Rondena M., Terrazzi V., Uboldi O., Coronas G., Gallazzi D., Grilli G.

RUOLO DELLE TONSILLE PALATINE NELLA PATOGENESI DELLA SCRAPIE OVINA.

Cancedda M. G., Demontis F., Di Guardo G., Ligios C., Marruchella G., Macciocu S., Denti S., Chiocchetti R.

INFETTIVITA' PRIONICA NEL LATTE DI PECORE ARQ/ARQ CON SCRAPIE E MASTITE DA VIRUS MAEDI-VISNA.

Ligios C., Cancedda M. G., Carta A., Santucciu C., Maestrone C., Demontis F., Tilocca M. G., Patta C., Melis P., Ibba B., Vargiu M. P., Sigurdson C. J.

INDAGINE QUALI-QUANTITATIVA SULLE CELLULE FOLLICOLARI DENDRITICHE RESIDENTI NELLE PLACCHE DEL PEYER ILEALI IN OVINI DI RAZZA SARDA.

Marruchella G., Ligios C., Di Guardo G.

ALTERAZIONI EMATOLOGICHE IN VITELLI DA CARNE CON "POLMONI VERDI".

Giori L., Stella S., Vandoni S., Sgoifo Rossi C. A., Radaelli E., Giordano A.

VALUTAZIONE DELLA CONTA DIFFERENZIALE DELLE CELLULE DEL LATTE IN RELAZIONE ALLO STATO SANITARIO DELLA MAMMELLA.

Pilla R., Asion D., Schwarz D., Piccinini R.

VALUTAZIONE CITOMETRICA DELL'ESPRESSIONE DI INTEGRINE IN RELAZIONE ALLO STATO METABOLICO IN BOVINE NEL PERIPARTO.

Gelain M. E., Malvisti M., Piccinini R., Zecconi A., Comazzi S.

ESPRESSIONE DELLE PROTEINE DI FASE ACUTA NEI PRESTOMACI DI BOVINI SANI.

Dilda Francesca, Pisani Laura Francesca, Restelli Laura, Rahman Mizanur Md, Modina Silvia, Tessaro Irene, Sartorelli Paola, Lecchi Cristina, Ceciliani Fabrizio

ESPRESSIONE DI miRNA IN MONOCITI BOVINI DOPO STIMOLAZIONE IN VITRO CON CHALLENGERS INFIAMMATORI.

Dilda F., Gioia G., Pisani L. F., Restelli L., Albonico F., Bronzo V., Mortarino M., Sartorelli P., Ceciliani F.

DIFFERENZIAZIONE NEUROENDOCRINA NEI TUMORI UROTELIALI ASSOCIATI A PAPILOMAVIRUS IN BOVINI ALIMENTATI CON FELCE.

Urraro C., Lucà R., Borzacchiello G., Perillo A., Leonardo L., Ferrari, Russo V., Roperto S.

L'ONCOPROTEINA E7 DEL PAPILOMAVIRUS BOVINO SI LEGA FISICAMENTE A P600 IN SARCOIDI EQUINI.

Corteggio A., Di Geronimo O., Roperto S., Roperto F., Borzacchiello G.

LA PARATUBERCOLOSI: ASPETTI PATOGENETICI, ZONOSICI E DIAGNOSTICI.

Rocca S., Cubeddu T., Farigu S., Leoni A.

STUDIO FOLLOW-UP SULL'INFEZIONE DA *Mycobacterium avium* sp. *paratuberculosis* IN UN GREGGE OVINO: RISULTATI SIEROLOGICI E ISTOPATOLOGICI.

Maestrone C., Sechi S., Ponti N., Demontis F., Denti S., Piazza G., Pedditzi A., Macciocu S., Lollai S., Casu S., Carta A., Ligios C.

ALTERAZIONI, ACCUMULO DI METALLI PESANTI E PRESENZA DI ADDOTTI AL DNA IN PARENCHIMI DI OVINI DELL'AREA DI PORTOSCUSO (SULCIS-IGLESIENTE – SARDEGNA). UN NECESSARIO CONFRONTO CON I DATI DEL 1992.

Farigu S., Rocca S., Carta G., Biggeri A., Catelan D., Peluso M., Leoni A.

ESPRESSIONE IMMUNOISTOCHEMICA DELLA METALLOTIONEINA (MT-1) NELLE NEOPLASIE DELLE GHIANDOLE APOCRINE DEL CANE.

Martano M., Restucci B., De Vico G., Maiolino P.

UTILITÀ DELL'ANALISI CITOFUORIMETRICA NELLA DEFINIZIONE DEL COINVOLGIMENTO MIDOLLARE NEI LINFOMI B DEL CANE.

Gelain M.E., Pintore L., Stefanello D., Marconato L., Romanelli G., Comazzi S.

L'USO DELLA CITOLOGIA E DELLA CITOCHIMICA NELLA CARATTERIZZAZIONE DELLE EPATOPATIE DEGENERATIVE NEL CANE.

Campora L., Marchetti V., Masserdotti C., Abramo F.

LA FIBROSI RENALE NEL CANE: EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION E RUOLO DELLE METALLOPROTEASI 2 E 9.

Aresu L., Benali S., Garbisa S., Gallo E., Castagnaro M.

ESPRESSIONE DELL' HMW-MAA NEI MELANOMI ORALI CANINI COME POTENZIALE TARGET TERAPEUTICO IN IMMUNOTERAPIA.

Maniscalco L., Aricò A., Mayayo S., De Maria R., Buracco P., Biolatti B., Iussich S.

ESPRESSIONE DELL'ANTI-MÜLLERIAN HORMONE (AMH) IN CELLULE DEL SERTOLI MATURE, IMMATURE E NEOPLASTICHE DI CANE.

Banco B., Bianchessi F., Giudice C., Grieco V.

MALATTIA DA ACCUMULO DI POLISACCARIDI (PSSM) IN UN CAVALLO DI RAZZA SELLA ITALIANA.

Sforna M., Pavone S., Prato S., Mandara M. T.

Poster

INFEZIONE DISSEMINATA DA *Mycobacterium avium* IN UN BASSET HOUND IN ITALIA.

Campora L., Zullino C., Corazza M., Ebani V., Abramo F.

NEOPLASIE DEL BOVINO: INDAGINE ANATOMO-ISTOPATOLOGICA SU VACCHE A FINE CARRIERA REGOLARMENTE MACELLATE.

Capucchio M.T., Bianco P., Ragazzoni L., Catalano D., Bollo E., Valenza F., Guarda F.

PRESENTAZIONE DEL PROGETTO "SHARING MOLECULAR TECHNIQUES FOR FOOD BORNE PATHOGEN DETECTION" (FoBoS).

Ceciliani F., Bonastre Armand S., Karus A., Lecchi C., Pisani L. F., Castiglioni B.

PRESENZA DI ZINCO IN CIPRINIDI DI UN'ASTA FLUVIALE DELLA CALABRIA: RILIEVI CHIMICI E OSSERVAZIONI ISTO-MORFOLOGICHE.

De Bonis S., Rossana F., Ferrandino I., Consiglio Grimaldi M., Coppola M., Di Napoli A., Melluso G.

REPERTI ANATOMO-ISTOPATOLOGICI, IMMUNOISTOCHEMICI E PARASSITOLOGICI IN CETACEI RINVENUTI SPIAGGIATI SULLE COSTE ITALIANE DAL 1998 AL 2009.

Di Guardo G., Marruchella G., Proietto U., Di Francesco C.E., Zucca P., Pennelli M., Mignone W., Tittarelli C., Casalone C., Iulini B., Bozzetta E., Garibaldi F., Scaravelli D., Mazzariol S., Fico R., Eleni C., Kennedy S., Di Cesare A., Traversa D.

EMORRAGIA INTRAVENTRICOLARE IN UN VITELLO SELEZIONATO DI RAZZA MARCHIGIANA IPERTROFICA.

Di Matteo I., Pavone S., Lepri E., Vitellozzi G., Mandara M.T.

ENCEFALITE DA MORBILLIVIRUS IN UNA STENELLA STRIATA (*Stenella coeruleoalba*)
RINVENUTA SPIAGGIATA SULLE COSTE LAZIALI.

Eleni C., Cocumelli C., Scholl F., Di Francesco C.E., Speranza R., Pennelli M., Di Guardo G.

MARKERS TUMORALI PER CELLULE STAMINALI IN NEOPLASIE MAMMARIE FELINE:
RISULTATI PRELIMINARI E ATTIVITA' DI SUPPORTO ALLA RICERCA.

Ferrari A., Campanella C., Cimadomo V., Migone L., Schiavetti I., Tiso M., Florio T., Barbieri F., Cardellino U., Petterino C., Turno P., Ratto A.

DESCRIZIONE DI UN FOCOLAIO DI UNA PATOLOGIA NEUROLOGICA IN CAVALLI DA CORSA.

Gibelli L.R., Cristian S., Canelli E., Barbieri I. Catella A., Gelmetti D.

TUMORI EPITELIALI CORNEALI PRIMARI: OSSERVAZIONI PRELIMINARI.

Giudice C., Marta M., Marco R., Valeria G.

UN CASO DI MUCORMICOSI IN UNA TIGRE.

Grieco V., Rondena M., Vallone L., Villa W., Giudice C.

PIGOMELIA CON POLIDATTILIA IN UN PULCINO: ASPETTI RADIOGRAFICI ED
ANATOMOPATOLOGICI.

Lanteri G., De Majo M., Caristina G., Monea C., Iannelli N., Caprì A., Macrì F.

PROVA SPERIMENTALE DI INDUZIONE DI MELANOSI IN SUINI NERI SICILIANI.

Lanteri G., Marino F., De Stefano C., Macrì B.

ASPETTI ANATOMO ISTO-PATOLOGICI ED IMMUNOISTOCHEMICI DEL MELANOMA
CUTANEO NEL SUINO NERO SICILIANO.

Lanteri G., Marino F., Ferrantelli V., Mazzullo G., Macrì B.

LESIONI ANATOMO-ISTOPATOLOGICHE OSSERVATE IN CINGHIALI DEL "PARCO GRAN
SASSO E MONTI DELLA LAGA" REGOLARMENTE MACELLATI.

Marruchella G., D'Ascanio D., Romanelli D., Di Nicola U.

MIOCARDITE GRANULOMATOSA DA *Candida albicans* IN UN CANARINO (*Serinus canaria*).

Marruchella G., Todisco G., D'Arezzo S., Di Guardo G., Paglia M.G.

PtP^{Sc} NELLE GHIANDOLE SURRENALI DI OVINI DI RAZZA SARDA INFETTATI
SPERIMENTALMENTE CON L'AGENTE DELLA SCRAPIE.

Marruchella G., Sciota D., Nonno R., Di Bari M.A., D'Agostino C., Vaccari G., Cosseddu G.M., De Grossi L., Agrimi U., Di Guardo G.

PILOMATRICOMA MALIGNO CON METASTASI OSSEA IN UN CANE.

Martano M., Navas L., Falletti J., Ilsami R., Meomartino Le., Maiolino P.

UN CASO DI NEUROFIBROMA DIFFUSO NELLE CAVITA' NASALI DI UN CANE.

Perillo L., Sfactoria A., Rapisarda G., Mazzullo G.

INDAGINE PRELIMINARE SULLA POSSIBILE PRESENZA DI SOSTANZA AMILOIDE (AA) IN
PRODOTTI LATTIERO-CASEARI BOVINI.

Pisani L.F., Rahman Mizan Md., Giorgetti S., Zorzoli I., Gallanti A., Bellotti V., Restelli L., Casula A., Sartorelli P., Cecilian F.

DESCRIZIONE DI UN FOCOLAIO DI POLIARTRITE DA *Mycoplasma mycoides* SUBS. *capri/LC* IN
CAPRE SICILIANE: ASPETTI ISTOPATOLOGICI ED IMMUNOISTOCHEMICI.

Puleio R., Agnello S., Chetta M., Nicholas R., Loria G.R.

DESCRIZIONE DI UN CASO DI MESOTELIOMA MALIGNO IN UN CANE.

Puleio R., Tamburello A., Schiavo M.R., Garofalo P., Poli A., Loria G.R.

CRIPTOCOCCOSI SISTEMICA IN UN GATTO IMMUNOCOMPETENTE.

Richelmi G., Goria M., Sant S., Varello K., Zoppi S, Romano S., Bozzetta E.

MIOPATIA IN UNA BOVINA: ASPETTI PATOLOGICI E CONSIDERAZIONI EZIOPATOGENETICHE.

Sfacteria A., Lanteri G., Caccamo G., Mazzullo G.

RISULTATI PRELIMINARI DI UNO STUDIO *IN VITRO* SULLA RISPOSTA DEI MACROFAGI BOVINI ALL'INFEZIONE CON *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

Snel G., Capoferri R., Marino R., Panelli S., Strozzi F., Piccinini R., Williams J.

VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA DELL' ENZIMA 11 β -IDROSSISTEROIDE DEIDROGENASI 1 E 2 IN COLTURE DI ADIPOCITI BOVINI TRATTATI CON DESAMETASONE E PREDNISOLONE.

Uslenghi F., Divari S., Cannizzo F.T., Demaria R., Pregel P., Biolatti B.

LOCALIZZAZIONE DI RECETTORI CD35 E CD16 IN CELLULE IMMUNOCOMPETENTI DI BRANZINO (*D. labrax*).

Volpatti D., Bulfon C., Pascotto E., Galeotti M.

ADENOCARCINOMA (ADENOMATOSI) POLMONARE OVINO: UN POSSIBILE MODELLO PER LO STUDIO DEL CARCINOMA BRONCHIOLOALVEOLARE NEI CARNIVORI DOMESTICI E NELL'UOMO

Livesu Giovanni M.¹, Cubeddu Tiziana¹, Rocca Stefano¹, Sechi Tiziana², Casu Sara², Sironi Giuseppe³, Valenza Federico⁴, Tanda Francesco⁵, Cousens Christine⁶, Leoni Antonio¹

¹*Dipartimento di Patologia e Clinica Veterinaria, Sezione di Patologia Generale e Anatomia Patologica, Facoltà di Medicina Veterinaria. Università degli Studi di Sassari.* ²*Research Unit, Genetics and Biotechnology, DiRPA-AGRIS, Sardegna-Italy.* ³*Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità pubblica, Università degli Studi di Milano.* ⁴*Dipartimento di Patologia Animale, Università degli Studi di Torino.* ⁵*Istituto di Anatomia Patologica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Sassari.* ⁶*Moredun Research Institute, Edinburgh EH26 OPZ, Scotland, UK*

Il carcinoma bronchioloalveolare (BAC) è un adenocarcinoma osservato nel cane, nel gatto e nell'uomo; è caratterizzato dalla trasformazione dei pneumociti di tipo II e delle cellule di Clara. Una neoplasia simile è rappresentata dall'Adenomatosi Polmonare Ovina (OPA), adenocarcinoma misto con prevalente pattern di BAC, causata dal betaretrovirus Jaagsiekte Sheep Retrovirus (JSRV). In questo studio abbiamo confrontato campioni di BAC, in forma pura o associata, appartenenti a 14 uomini, 14 cani, 10 gatti e 2 ovini. Come controlli negativi sono stati esaminati campioni di tessuto polmonare sano di uomo, cane e gatto; come controlli positivi sono stati utilizzati dei tessuti polmonari di pecora con OPA. Le neoplasie sono state identificate secondo le rispettive classificazioni. I campioni che mostravano pattern tumorali simili sono stati sottoposti ad indagini immunocitochimiche utilizzando un anticorpo contro la proteina capsidica (CA) del JSRV. La verifica della presenza di trascritti della porzione del gene gag, codificante per CA, è stata effettuata tramite retrotrascrizione, amplificazione e sequenziamento dell'RNA estratto dagli stessi campioni. Dai risultati ottenuti sono emerse nuove analogie istologiche tra il BAC dell'uomo e dei carnivori domestici con l'OPA e positività immunocitochimica citoplasmatica nei campioni indagati. Inoltre le indagini molecolari hanno evidenziato l'espressione della porzione CA del gene gag JSRV-like e, contemporaneamente, l'assenza di espressione del gene env del JSRV in tutti i campioni indagati. Alla luce di questi risultati si possono formulare due ipotesi: 1) che si tratti di sequenze endogene JSRV-like espresse durante o in seguito a trasformazione neoplastica delle cellule bersaglio (determinata da altre cause); 2) di sequenze appartenenti ad un "nuovo" retrovirus JSRV-like capace di infettare i pneumociti di tipo II e le cellule di Clara dell'uomo e dei carnivori domestici.

Parole chiave: carcinoma bronchioloalveolare, adenocarcinoma polmonare ovino, immunocitochimica, RT-PCR, sequenze.

SHEEP PULMONARY ADENOCARCINOMA (ADENOMATOSIS): A POSSIBLE MODEL FOR THE STUDY OF BRONCHIOLOALVEOLAR CARCINOMA IN DOMESTIC CARNIVORES AND HUMANS

The bronchioloalveolar carcinoma (BAC) is a type of pulmonary adenocarcinoma observed in several animal species (including dogs and cats) and humans. The tumour cells are originated from neoplastic transformation of type II pneumocytes and Clara cells. A similar disease of sheep is the Ovine Pulmonary Adenomatosis (OPA), a mixed adenocarcinoma with predominant BAC pattern, caused by JSRV, a Betaretrovirus. In this work we have compared samples of lung tumours coming from 14 men, 14 dogs, 10 cats, 2 sheep, with a BAC pattern (pure or in combination form). Negative controls were represented by lung tissue of man, dog and cat free of cancer "in situ", while positive controls were represented by two samples of OPA. The samples that showed a similar histopathological pattern were examined through immunohistochemistry with a polyclonal antibody directed against the JSRV capsid protein. The demonstration of transcripts of the gag-gene portion (encoding capsid protein) by extracting RNA, liquid phase RT-PCR and sequencing of amplified was performed. Our results have demonstrated the presence of gag-JSRV-like sequences in all cases of dog, cat and human bronchioloalveolar carcinoma.

Key words: bronchioloalveolar carcinoma, sheep pulmonary adenocarcinoma, immunohistochemistry, RT-PCR, sequences.

RILIEVI POST-MORTEM IN UNO SPIAGGIAMENTO DI MASSA DI 7 CAPODOGLI (*Physeter macrocephalus*)

Mazzariol Sandro¹, Petrella Antonio², Troiano Giuseppe², Zizzo Nicola³, Passantino Giuseppe³, Giuriso Maristella⁴, Marcer Federica⁴, Mattiucci Simonetta⁵, Nascetti Giuseppe⁶, Pavan Gianni⁷, Podestà Michela⁸, Beraldo de Quiros Miranda Yara⁹, Marsili Letizia¹⁰, Fossi M. Cristina¹⁰, Ferrante Margherita¹¹, Mario Tringali¹², Pennelli Massimiliano¹³, Marruchella Giuseppe¹³, Di Guardo Giovanni¹³

1. Dip. di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria, Università di Padova. 2. IZS della Puglia e della Basilicata. 3. Dip. Sanità Pubblica e Benessere degli Animali, Università di Bari. 4. Dip. di Scienze Sperimentali Veterinarie, Università di Padova. 5. Dip. di Sanità Pubblica, Università La Sapienza (Roma). 6. Dip. di Ecologia e di Sviluppo Economico Sostenibile, Università della Tuscia (Viterbo). 7. Dip. di Biologia Animale, CIBRA, Università di Pavia. 8. Museo Civico di Storia Naturale di Milano. 9. Dep. de Morfologia, Università de Las Palmas de Gran Canaria. 10. Dip. di Scienze Ambientali, Università di Siena. 11. Dip. di Igiene e Sanità "Ingrassia", Università di Catania. 12. Centro Studi Cetacei Onlus (CSC). 13. Dip. di Scienze Biomediche Compare, Università di Teramo

Gli spiaggiamenti di massa di cetacei sono eventi di difficile comprensione e le loro cause sono ancora sconosciute nonostante le numerose ricerche e le varie ipotesi avanzate. Sono piuttosto rari nel Mar Mediterraneo, in particolare quelli che coinvolgono specie di grandi dimensioni. Nel dicembre 2009 si sono arenati 7 maschi sub-adulti di capodoglio (*Physeter macrocephalus*) lungo le coste settentrionali della Puglia. Il coordinamento dell'intervento per le indagini post-mortem è stato affidato dal Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare all'Unità per la necropsia dei grandi cetacei, costituita presso la Facoltà di Medicina Veterinaria di Padova, in collaborazione con varie realtà veterinarie e gruppi di ricerca italiani. Tale collaborazione ha permesso di ottenere molte informazioni di carattere ecologico, biologico, patologico e tossicologico. In particolare, gli esami post-mortem effettuati sui 3 soggetti morti più recentemente hanno escluso i principali agenti patogeni neurotropi conosciuti nei cetacei (*Morbillivirus*, *Herpesvirus*, *Brucella*, *Toxoplasma gondii*, biotossine algali), i principali metalli pesanti tossici (Hg, Pb e Cd) e la *gas and fat embolic syndrome*, associata all'esposizione diretta ai sonar. Le indagini hanno comunque evidenziato, oltre alle lesioni riferibili allo spiaggiamento, una deplezione linfocitaria nei linfonodi e una lipofuscinosi muscolare e neuronale. Quest'ultima, insieme agli esiti delle prove biologiche effettuate, suggerisce il possibile coinvolgimento di un agente neurotossico. L'analisi del contenuto stomacale indicava un digiuno di almeno 5 giorni. Al termine delle indagini, valutati anche i parametri geografici e climatici, è stata proposta una condizione multifattoriale come possibile causa dello spiaggiamento.

Parole chiave: capodogli, spiaggiamento di massa, Mar Mediterraneo.

POST-MORTEM FINDINGS IN A MASS STRANDING OF 7 SPERM WHALES (*Physeter macrocephalus*)

Cetacean mass strandings are not yet understood events and their causes are still unknown in spite lots studies performed and various hypothesis proposed. They are quite rare in the Mediterranean sea, in particular those involving large animals. In December 2009, 7 juvenile male sperm whales (*Physeter macrocephalus*) stranded along the northern Apulian coastline. The Italian Ministry of the Environment entrusted the Unit for Large Cetaceans Necropsy, established at the Faculty of Veterinary Medicine of Padua, to coordinate necropsies with other Italian veterinary institutions and research groups. This collaboration allowed to obtain several ecological, biological, pathological and toxicological data on this species. In particular, post-mortem examinations on the 3 more recently died whales excluded all neurotropic pathogens reported in cetaceans (*Morbillivirus*, *Herpesvirus*, *Brucella*, *Toxoplasma gondii*, algal toxins), main toxic heavy metals (Hg, Pb, Cd) and the *gas and fat embolic syndrome*, associated to a direct exposure to sonars. Besides changes related to the stranding events, pathological studies showed a lymphoid depletion in the lymph nodes and a muscular and neuronal lipofuscinosis. The last finding and results from biological trials suggested a possible role of a neurotoxic agent. A fasting period of at least 5 days was suspected by the evaluation of the gastric contents. At the end of the exams, considering geographical and meteorological data, a multifactorial condition was proposed as the likely cause of stranding.

Key words: sperm whales, mass stranding, Mediterranean Sea.

DESCRIZIONE DI UN EPISODIO DI INFESTAZIONE DA *Sciadicleithrum variabilum* IN UN ALLEVAMENTO DI DISCUS (*Symphysodon discus*)

Gibelli Lucia Rita¹, Aquaro Giovanni², Salogni Cristian¹, Galli Paolo², Gelmetti Daniela¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Via A. Bianchi, 9 - 25100 Brescia. ² Dipartimento di Biotecnologie e Bioscienze, Università degli Studi di Milano Bicocca

Le malattie parassitarie sono altamente diffuse nell'allevamento dei pesci e sono fra le più importanti patologie che colpiscono i pesci ornamentali. Durante l'inverno 2009 in un allevamento della provincia di Brescia, si osservava un episodio di alta mortalità in giovani discus. I pesci mostravano sintomi respiratori, anoressia cui seguiva perdita di peso e morte. All'esame autoptico, in pesci di 3-10 cm le branchie erano iperemiche, con emorragie diffuse, ricoperte da un abbondante muco grigiastro. Microscopicamente i raschiati branchiali mostravano numerosi parassiti allungati, più di 200 per ogni singolo ospite, muniti di organi adesivi, dei appartenenti alla classe *Monogenoidea*. Istologicamente le branchie mostravano una flogosi linfo-eosinofila, lamelle primarie fuse insieme, necrosi multifocali e numerosi corpi parassitari (da 1 a 8) erano ancorati ad ogni singola lamella primaria. L'esame parassitologico identificava i parassiti come appartenenti alla specie *Sciadicleithrum variabilum*. E' stata caratterizzata una regione di DNA codificante per la citocromo ossidasi I (COI), per rendere possibile in futuro l'identificazione rapida della specie considerata, *S. variabilum*. L'elevata temperatura di allevamento e le assidue cure parentali tipiche della specie favoriscono il moltiplicarsi e la trasmissione di *Sciadicleithrum variabilum*. La massiccia infestazione della delicata struttura branchiale in discus di giovani età è direttamente correlabile all'alta mortalità osservata nell'episodio descritto.

Parole chiave: *Sciadicleithrum variabilum*, *Monogenoidea*, *Dactylogyridae*, DNA barcoding, *Discus*, infezioni dei pesci ornamentali.

SCIADICLEITHRUM VARIABILUM INFECTION IN BREEDING DISCUS (*Symphysodon discus*)

Parasitic diseases are extremely diffused and are one of the most important causes of mortality in the ornamental fish trading. This work describes a *Sciadicleithrum variabilum* infection in Italian breeding discus, that occurred during winter 2009, causing high mortality in young fishes. Affected fishes showed anorexia and respiratory distress. Histologically, branchial filaments were influxed of mononuclear cells. Epithelial cells were hyperplastic, fused together and focally necrotic. Several elongated parasite bodies, comprised from 1 to 8, rarely complete, lie down on secondary gill lamellae, attached with the haptor. Moreover, a partial region of the cytochrome oxidase I gene (COI) was sequenced in order to obtain a molecular marker for future identification of *S. variabilum* species. Our report suggests that is extremely important to control infections in breeding discus stocks through the appropriate use of therapeutic prophylaxes and good management practices: sanitary stops, precocious separation of offspring from parents, quarantine and treatment of new introduced fishes.

Key words: *Sciadicleithrum variabilum*, monogenoidean dactylogyrid, discus, ornamental fish infection, DNA barcoding.

VALORI EMATOLOGICI E BIOCHIMICI IN RICCI (*Erinaceus europaeus*) DOPO RIABILITAZIONE PRESSO CENTRI DI RECUPERO

Rossi Gabriele¹, Martino Volta Nicoletta¹, Mangiagalli Gerard², Paltrinieri Saverio¹

¹Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria – Sezione di Patologia Animale e Parassitologia – Università degli Studi di Milano Via Celoria, 10 – 20133 - Milano

²Clinica Veterinaria Europea – P.zza Napoli 30/6 - 20146 - Milano

In letteratura non sono riportati intervalli di riferimento (IR) biochimici ed ematologici del riccio comune (*Erinaceus europaeus*), forse per la difficoltà di cattura e prelievo degli animali. La mancanza di queste informazioni ostacola l'interpretazione dei test di laboratorio, spesso eseguiti presso centri di recupero perché il riccio può fungere da vettore di zoonosi e da bioindicatore per l'inquinamento ambientale da metalli pesanti.

Obiettivo del lavoro è stabilire IR ematologici e biochimici di ricci ospitati in centri di recupero, valutando l'influenza del sesso e del tipo di management.

I ricci provenivano da 3 centri: in uno sono nati e cresciuti, negli altri erano stati ricoverati in inverno dopo essere stati prelevati sul territorio in ottobre. I ricci erano alimentati con mangime commerciale e, ad eccezione di 3 soggetti, hanno saltato il letargo invernale. Gli animali sono stati classificati come sani in base alla visita clinica e alla misurazione di parametri biometrici di base effettuati al momento del ricovero. In primavera, prima del rilascio, è stato prelevato il sangue per effettuare gli esami ematologici e biochimici. Gli IR sono risultati simili a quelli di molte specie domestiche con alcune eccezioni: la percentuale di linfociti (talvolta granulari) è maggiore di quella dei neutrofili (di cui circa il 5% presentava nucleo bilobato); i basofili sono sempre presenti; la percentuale di eosinofili mostra un'alta variabilità individuale; rispetto ad altre specie, ALT e GGT sono marcatamente elevate, e urea e trigliceridi, modicamente elevati e bassi, rispettivamente. Il tipo di management non influenza in modo biologicamente significativo i dati ematologici o biochimici, pur in presenza di modiche differenze statisticamente significative. Non sono invece state osservate differenze legate al sesso.

Parole chiave: riccio, intervalli di riferimento, esami di laboratorio.

HEMATOLOGICAL AND BIOCHEMICAL VALUES OF HEDGEHOGS (*Erinaceus europaeus*) AFTER OVERWINTERING IN REHABILITATION CENTRE

Hematological and biochemical reference intervals (RI) for healthy European hedgehogs (*Erinaceus europaeus*) are not present in literature, probably due to the difficulties in capture and blood sampling. The lack of RI hampers the interpretation of laboratory data often required since hedgehogs could be a reservoir for zoonoses, and a bio-indicator for environmental heavy metal pollution. The aim of the study is to establish hematological and biochemical RI before the release into the wild and to assess gender and management influence. The hedgehogs were hospitalized in 3 rehabilitation centres: in one born and growth whereas in the others they were overwintered. All hedgehogs were fed with commercial food and they skip hibernation except for 3 of them. Based on physical examination and biometrical parameters at admission, hedgehogs were classified as healthy. In spring, before being released, blood was drawn for routine hematological and biochemical tests. RI are similar to those of common domestic species with a few exceptions: lymphocytes (occasionally granular) were more abundant than neutrophils (of which about 5% with bilobated nuclei); basophils were always present; eosinophils had a high individual variability; ALT and GGT were markedly higher than in other species and urea and triglycerides slightly higher and lower, respectively. The management do not biologically influence the results even if slight statistical differences could be observed. No significant gender-related differences were found.

Key words: hedgehog, reference interval, laboratory exams.

MALFORMAZIONI CARDIOVASCOLARI NEL VITELLO: CONTRIBUTO CASISTICO

Binanti Diana, Morandi Nicola*, Rondena Marco, Pravettoni Davide*, Riccaboni Pietro

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

Le malformazioni dell'apparato cardiovascolare del bovino sono eventi relativamente rari di cui non sono note cause eziologiche precise. I difetti del setto interventricolare sembrano essere quelli meno infrequenti assieme a quelli atriali, alla trasposizione dell'aorta e dell'arteria polmonare nonché alle cisti ematiche valvolari. A queste malformazioni si deve aggiungere la persistenza del dotto interarterioso. Tutte queste lesioni possono presentarsi sia singolarmente che fra loro associate. I meccanismi compensatori neuro-ormonali possono inibire lo sviluppo di un quadro sintomatologico che, quando presente, non è sempre diagnostico. In due anni di attività diagnostica necroscopica, sugli 82 vitelli di età compresa entro i 4 mesi di vita conferiti, sono stati osservati e descritti 23 casi di malformazioni cardiovascolari, prevalentemente costituite dalla persistente pervietà del dotto interarterioso, dalla mancata chiusura del foro interatriale ed in minor misura, dal foro interventricolare e dalla trasposizione e stenosi dei grandi vasi arteriosi. Le lesioni osservate erano talvolta associate a patologia sia infiammatoria che congestizia dell'apparato respiratorio. Il presente lavoro si prefigge di segnalare l'incidenza della patologia cardiopolmonare congenita nella specie bovina e di considerarne il ruolo di possibile causa predisponente occulta per le frequenti sindromi respiratorie del vitello.

Parole chiave: vitello, cuore, malformazioni cardiovascolari.

CONGENITAL CARDIOVASCULAR ABNORMALITIES IN CALVES: A RETROSPECTIVE STUDY

Congenital cardiovascular defects are relatively rare in cattle. Ventricular septal defect being the most common cardiovascular abnormality in the bovine neonates and atrial septal defect, transposition of aorta and pulmonary artery, valvular hematomas and patent ductus arteriosus are also described. The neuro-hormonal compensatory mechanisms could prevent clear clinical symptoms. The present study concern description of cardiovascular malformations detected in 23 out of 82 calves routinely necropsied in latest 2 years. The most common observed lesions were consistent with patent ductus arteriosus, atrial septal defect and lesser numbers of ventricular septal defect, and transposition of aorta and pulmonary artery. The lesions were often associated to respiratory disease. The study indicates the relative high incidence of the congenital cardiovascular pathologies, often with subclinical course, and speculate their rule as predisposing factor for the respiratory syndromes of calves.

Key words: calf, hearth, cardiovascular malformations.

RICERCA DI SANGUE OCCULTO NELLE FECI IN SUINI DI ALLEVAMENTO INTENSIVO COME INDICATORE DI ULCERA GASTROESOFAGEA

Binanti Diana, Benedetti Valentina*, Rondena Marco, Vezzoli Fausto*, Riccaboni Pietro

*Facoltà di Medicina Veterinaria – Polo di Lodi. Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria. *Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lombardia e Emilia Romagna – Sezione Diagnostica di Lodi*

L'ulcera gastroesofagea (UGE) del suino è una patologia di frequente riscontro negli allevamenti intensivi, la sua importanza è legata soprattutto al marcato decremento delle produttività. Essa è perlopiù caratterizzata da un decorso subclinico ed è quindi difficilmente diagnosticabile in vita anche per l'assenza di strumenti clinici standardizzati e facilmente applicabili su larga scala. Lo scopo del presente lavoro è di valutare l'efficacia e l'applicabilità del test per la ricerca di sangue occulto nelle feci per uso umano (Hemocult SENSA) in suini provenienti da allevamenti intensivi. Oggetto di studio sono stati 30 suini deceduti spontaneamente, sui quali è stata effettuata l'indagine per la ricerca del sangue occulto nelle feci. I soggetti sono stati in seguito sottoposti ad esame autoptico durante il quale è stata valutata la mucosa gastrica, assegnando un punteggio progressivamente crescente in funzione della gravità della lesione eventualmente presente. Sulla *pars oesophagea* e sulla mucosa ghiandolare sono stati eseguiti approfondimenti istologici. I risultati ottenuti sono stati correlati con i risultati del test per la ricerca del sangue occulto nelle feci. In 11 soggetti è stata evidenziata la presenza di UGE. In solo 8 soggetti il test ha dato esito positivo, di questi 5 presentavano UGE e 3 ne erano privi (falsi positivi). Dei 22 soggetti negativi al test, 6 erano portatori di UGE (falsi negativi). Sulla base dei risultati preliminari ottenuti, la ricerca del sangue occulto nelle feci potrebbe quindi divenire un ausilio di diagnosi intravitale, riducendo l'elevato impatto economico derivante da una diffusa e subdola tecnopatia multifattoriale come l'ulcera gastroesofagea del suino. Ulteriori studi su una popolazione più ampia saranno necessari per una definitiva validazione.

Parole chiave: suino, ulcera gastroesofagea, sangue occulto.

DETECTION OF FAECAL OCCULT BLOOD IN GROWING PIGS AS INDICATOR OF PRESENCE OF GASTROESOPHAGEAL ULCER

Gastroesophageal ulcer (GEU) is an important disease of swine causing severe economic losses. Intra vitam diagnose of GEU is difficult, due to lack of clinical symptoms. The aim of this study is to evaluate the effectiveness and applicability of tests for the detection of faecal occult blood in detection of swines carrier of GEU. For the present study 30 pigs, spontaneously died for various causes, not directly related to GEU were investigated. Test for faecal occult blood was performed by means of rectal swab from each subject. In all pigs, the necropsy was performed and the lesions of *pars oesophagea* were recorded and scored. The morphological findings were related with the blood presence in fecal swab. GEU was detected in 11 out of 30 subjects. Test was positive in 8 subjects, 5 presenting GEU and 3, false positive, free. In 6 out 22 animals test was negative despite presence of GEU. The present study seems to indicate good perspective in application of the faecal occult blood test for early detection of GEU.

Key words: swine, gastroesophageal ulcer, occult blood.

ASPETTI ULTRASTRUTTURALI DELL'ITTIOSI BOVINA: STUDIO PRELIMINARE

Brachelente Chiara, Lepri Elvio, Sforna Monica, Mechelli Luca, Capuccini Silvia

Dipartimento di Scienze Biopatologiche e Igiene delle Produzioni Animali e Alimentari Università di Perugia

Le ittiosi comprendono un gruppo di patologie cutanee ereditarie, clinicamente ed eziologicamente eterogenee, caratterizzate da difetti della cheratinizzazione; tali disordini sono stati segnalati nell'uomo, bovino, cane, maiale, pollo, topo e lama.

Nell'uomo la classificazione delle ittiosi congenite si basa sugli aspetti clinici, istologici ed ultrastrutturali nonché sull'identificazione dei geni coinvolti nel determinismo della malattia; si distinguono forme:

Non sindromiche

- Ittiosi volgare dominante
- X-linked ittiosi recessiva
- Ittiosi congenite autosomiche recessive –ARCI-
- Ittiosi cheratinopatiche –KPI-

Sindromiche

- X-linked: IFAP, Conradi-Hünemann-Happle, ecc.
- Autosomiche: Netherton, Sjögren-Larsson, Refsum, ecc.

Nel bovino si riconoscono l'ittiosi fetale (grave e letale) e l'ittiosi congenita (forma meno grave e compatibile con la vita). Entrambe sembrano essere causate da una mutazione genica autosomica recessiva che, nell'IF del bovino di razza Chianina, è stata localizzata nel gene ABCA12.

In entrambe le forme, l'alterazione istologica, sebbene con gradi e localizzazioni anatomiche variabili, è sempre rappresentata da una ipercheratosi ortocheratosica lamellare dell'epidermide e dei follicoli piliferi.

I due modelli di ittiosi bovina risultano simili alle ARCI dell'uomo, con una corrispondenza tra la forma congenita del bovino e l'ittiosi lamellare (LI) e tra la forma fetale del bovino e l'ittiosi arlecchino dell'uomo (HI).

Nel nostro studio, gli aspetti istologici ed ultrastrutturali di 4 casi di ittiosi (3 fetali ed 1 congenita) sono stati comparati con quelli riscontrati nelle ARCI dell'uomo, al fine di valutare eventuali similitudini, permettere un migliore inquadramento ed ampliare le conoscenze sulla patogenesi della malattia nella razza chianina. Gli studi preliminari effettuati hanno evidenziato un pattern di lesioni elettromicroscopiche sovrapponibili ai quadri descritti in medicina umana per le ARCI LI ed HI.

Parole chiave: bovino, ittiosi, ultrastruttura, ipercheratosi.

ULTRASTRUCTURAL FINDINGS IN BOVINE ICHTHYOSIS: PRELIMINARY STUDY

Ichthyosis includes a clinically and etiologically heterogeneous group of hereditary skin diseases, characterized by keratinization defects and affecting human beings, bovine, dog, pig, chicken, mice and llama. In human medicine, ichthyoses are classified according to clinical, histological and ultrastructural features and according to the responsible genes. Syndromic and non syndromic forms, each with different subtypes, are recognized. In cattle, two forms of the disease - fetal (severe and lethal) and congenital (less severe, compatible with life) - are currently acknowledged. Both seem to be caused by recessive autosomal gene mutations that have been identified in the ABCA12 gene in the IF of the Chianina breed. The common histopathological lesion, although with different degrees and localization, is a lamellar orthokeratotic hyperkeratosis of the epidermis and hair follicles. Some analogies have been demonstrated between the bovine and human forms with a correspondence between the congenital form in cattle and the lamellar ichthyosis in men and between the fetal form of bovine and arlequin ichthyosis of men. The electron-microscopical analysis in 4 bovine cases in our study (3 fetal and 1 congenital) allowed us to demonstrate an ultrastructural pattern similar to what described in lamellar and arlequin ichthyosis in human beings.

Key words: bovine, ichthyosis, ultrastructure, hyperkeratosis.

ENTEROPATIA DA *Enterococcus* SPP ASSOCIATA A SINDROME ALOPECICA IN CONIGLI LATTANTI

Rondena Marco, Ferrazzi Viviana, Uboldi Osvaldo*, Coronas Giovanni, Gallazzi Daniele, Grilli Guido

*DIPAV, Sezione di Anatomia Patologica e Patologia Aviare, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Milano; * Cargill, Animal Nutrition Italia*

INTRODUZIONE: Tra i problemi sanitari del coniglio di allevamento intensivo un ruolo di primo piano è rivestito dalle patologie dell'apparato enterico del periodo post – svezzamento. Negli ultimi anni, inoltre, si assiste ad un aumento di patologie della sfera gastroenterica anche nella fase neonatale con evidenza in allevamento di forme cliniche caratterizzate da lieve diarrea, crescita stentata, alopecia e mortalità. La presente segnalazione riguarda la descrizione e gli approfondimenti diagnostici effettuati in due episodi relativi ad allevamenti del Veneto e del Piemonte. **MM:** 10 conigli neonati, di cui alcuni sottoposti ad eutanasia, di età compresa fra i 7 ed i 14 giorni sono stati sottoposti a necroscopia, durante la quale sono stati prelevati campioni di intestino, fegato, milza e cute per istologia, nonché di contenuto intestinale per esami batteriologici. **RISULTATI:** tutti i soggetti presentavano alopecia diffusa e moderato imbrattamento fecale nella zona perianale. In due casi sono state rilevate anche lesioni cutanee da cui è stato isolato *S. aureus*. Istologicamente in 5 soggetti è stata evidenziata la presenza di numerosi cocci Gram positivi adesi ai microvilli dell'intestino tenue (duodeno e digiuno in prevalenza), in completa assenza di flogosi. A livello cutaneo si è evidenziata ipercheratosi e cheratosi follicolare diffusa. All'esame batteriologico sono stati isolati cocci Gram positivi, che le prove biochimiche per l'identificazione di specie hanno dimostrato essere *Enterococcus faecium*, *E. durans* ed *E. hirae*. **DISCUSSIONE E CONCLUSIONI:** Il quadro istologico enterico con la presenza di batteri adesi in assenza di flogosi, è riconducibile ad enteropatia. L'esatta patogenesi delle lesioni cutanee, non è attualmente definita, sebbene sia descritta una forma simile in ratti lattanti. La presenza di *Enterococcus* spp. a livello del margine luminale degli enterociti potrebbe causare malassorbimento con conseguente sviluppo di forme carenziali secondarie.

Parole chiave: coniglio, enteropatia, alopecia, *Enterococcus* spp.

***Enterococcus* SPP ENTEROPATHY ASSOCIATED WITH ALOPECIC SYNDROME IN SUCKLING RABBITS**

INTRODUCTION: Enteric diseases are a well known causes of death and culling in growing and fattening commercial rabbits. In the latest years, however, enteric problems associated with poor growth and diffuse alopecia were also reported in neonates rabbits. Aim of the present study was to describe two different episodes of enteropathy and alopecia in rabbits, occurred in northern Italy in 2009. **M&M:** 10 neonatal rabbits, 7-21 days of life, were examined. Full necropsy was performed and samples for histology and bacteriology collected. **RESULTS:** all rabbits had diffuse alopecia and fecal smears around the anal region. In 2 rabbits pyoderma, consistent with *S. aureus* infection, was found. Histologically, in 5/15 intestines innumerable cocci were present, adherent to luminal margin of enterocytes, without mucosal inflammation. Bacteriology and biochemical analysis identified *Enterococcus faecium*, *E. durans* and *E. hirae*. Skin was characterized by severe, diffuse lamellar hyperkeratosis and follicular keratosis in absence of dermatitis. **DISCUSSION AND CONCLUSION:** Enteric lesions consistent with enteropathy caused by *Enterococcus* seems to be related to cutaneous hyperkeratosis. Despite similar condition has also been reported in rat, exact pathogenetic mechanism is still poorly understood. A malabsorption syndrome, related to enteropathy, could be hypothesized.

Key words: rabbit, alopecia, *Enterococcus* spp., enteropathy.

RUOLO DELLE TONSILLE PALATINE NELLA PATOGENESI DELLA SCRAPIE OVINA

Cancedda Maria Giovanna¹, Demontis Francesca¹, Di Guardo Giovanni², Ligios Ciriaco^{1*}, Marruchella Giuseppe², Macciocu Simona¹, Denti Stefano¹, Chiocchetti Roberto³

¹ Istituto Zooprofilattico della Sardegna, Sassari. ² Università degli Studi di Teramo, Dipartimento di Scienze Biomediche Comparate. ³ Università degli Studi di Bologna, Dipartimento di Morfofisiologia Veterinaria e Produzioni Animali

Nella scrapie ovina le tonsille palatine (TP) sono uno dei primi distretti linfatici ad essere interessati dall'accumulo della proteina prionica patologica (PrP^{Sc}). Dopo la sua deposizione nel tessuto linfatico associato all'intestino, la PrP^{Sc} raggiunge il sistema nervoso centrale (SNC) tramite le vie nervose simpatiche e parasimpatiche vagali.

Recentemente il nostro gruppo di ricerca ha caratterizzato, utilizzando dei traccianti fluorescenti retrogradi, l'innervazione delle TP, che risultano essere connesse al SNC tramite numerosi gangli simpatici e parasimpatici.

Queste conoscenze sollevano interessanti quesiti sul possibile ruolo delle TP come via di accesso dell'agente eziologico della scrapie al SNC. In questo studio abbiamo cercato di definire il ruolo che le TP possono giocare nella patogenesi della neuroinvasione nella scrapie e, in particolare, abbiamo verificato se la PrP^{Sc} dalle TP raggiunga direttamente il SNC per via nervosa e/o linfo-ematogena.

A tal fine abbiamo inoculato per via intra-tonsillare, con un omogenato di tessuto cerebrale di un ovino affetto da scrapie, 6 agnelli di 40 giorni d'età (n. 3 ARQ/ARQ_{wildtype}, n. 2 ARQN₁₇₆/ARQK₁₇₆ e n. 1 ARQ/ARR). In questi agnelli, abbattuti serialmente e sottoposti ad indagini immunoistochimiche, la PrP^{Sc} è stata riscontrata solo in 2 soggetti ARQ/ARQ_{wildtype} sacrificati a 106 gg. e 211 gg. post-infezione. In particolare, dopo 106 gg la PrP^{Sc} è stata riscontrata solo a livello della tonsilla inoculata e del linfonodo retrofaringeo omolaterale, mentre a 211 gg la PrP^{Sc} risultava localizzata anche a livello di numerosi altri distretti linfatici, ad eccezione di quelli associati con il tratto gastro-enterico.

In questi due animali la PrP^{Sc} non è stata riscontrata sia nell'SNC sia nel sistema nervoso periferico simpatico e parasimpatico. Da questi risultati preliminari possiamo ipotizzare che, anche in seguito ad infezione intra-tonsillare, l'agente causale della scrapie possa replicare primariamente nel sistema linfatico, a livello del quale si diffonderebbe per via linfo-ematogena.

Parole chiave: scrapie, tonsilla palatina, PrP^{Sc}, ovino.

ROLE OF PALATINE TONSILS IN SHEEP SCRAPIE PATHOGENESIS

The sheep scrapie prion gains access to the central nervous system (CNS) from the gastro-intestinal tract by the sympathetic and vagal nerve routes. We have recently characterized, by injecting a retrograde fluorescent tracer into ovine palatine tonsils (PTs), a number of sympathetic and parasympathetic ganglia innervating and directly connecting PTs to the CNS.

At the light of these findings, we hypothesized that PrP^{Sc} may colonize CNS directly from PTs, either travelling along the neural network or by the lympho-haematogenous route (or both). To test this we injected a brain homogenate from scrapie-affected Sarda sheep into the PT of 40 days-old Sarda breed lambs carrying different PrP genotypes.

Following euthanasia at consecutive time intervals, we detected by immunohistochemistry PrP^{Sc} within the inoculated PT and in the ipsilateral retropharyngeal lymph node in 1 ARQ/ARQ_{wildtype} lamb at 106 days post-inoculation (pi) and in another ARQ/ARQ_{wildtype} lamb at 211 days pi. In the latter animal PrP^{Sc} deposition occurred in several other lymphoid districts but not in gut-associated lymphoid tissues. Interestingly enough, no PrP^{Sc} was detected in the sympathetic and parasympathetic ganglia connected to PTs. These preliminary results suggest that in the early stages of scrapie infection lymphoid organs may act as primary prion replication sites also in the case of intra-tonsillar infection.

Key words: scrapie, palatine tonsil, PrP^{Sc}, sheep.

INFETTIVITA' PRIONICA NEL LATTE DI PECORE ARQ/ARQ CON SCRAPIE E MASTITE DA VIRUS MAEDI-VISNA

Ligos Ciriaco¹, Cancedda Maria Giovanna¹, Carta Antonello², Santucci Cinzia¹, Maestrale Caterina¹, Demontis Francesca¹, Tilocca Maria Giovanna¹, Patta Cristiana¹, Melis Paola¹, Ibbia Bernardetta, Vargiu Maria Pina, Sigurdson Christina J.³

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Sassari. ² Research Unit: Genetics and Biotechnology, DIRPA, AGRIS, Olmedo (SS). ³ Department of Pathology, School of Medicine, University of California San Diego, USA.

Nella pecora la scrapie è caratterizzata dall'accumulo di proteina prionica patologica (PrP^{Sc}) nel sistema nervoso centrale (SNC) e nel sistema linfo-reticolare (SLR). Qualora siano presenti fenomeni infiammatori linfo-follicolari, la PrP^{Sc} si accumula anche in altri organi, mammella inclusa. Nel nostro studio abbiamo indagato se le mastiti linfo-follicolari in pecore affette da scrapie determinano la produzione di latte contenente infettività prionica. Allo scopo da 1,1 a 2,1 litri di latte provenienti da pecore precedentemente inoculate con Maedi-Visna virus (MVV) e con omogenato di cervello di pecora affetta da scrapie sono stati somministrati individualmente *per os* a 8 agnelli ARQ/ARQ. Ad altri 3 agnelli ARQ/ARQ venivano somministrati da 1,4 a 1,7 litri di latte provenienti da pecore affette da scrapie ma con la mammella istologicamente nella norma.

Tra gli agnelli che avevano ricevuto il latte di pecore con scrapie e mastite, 4 hanno manifestato segni clinici di scrapie a 23-28 mesi post-infezione (pi), mentre altri 2 sono rimasti clinicamente sani, sebbene, una volta sacrificati a 28 e 29 mesi pi, sono stati riscontrati con depositi di PrP^{Sc} sia nel SNC che nel SLR. I rimanenti 2 agnelli dello stesso gruppo, morti per cause non legate alla scrapie durante l'esperimento, non avevano PrP^{Sc} sia nel SNC sia nel SLR. I 3 agnelli alimentati con latte proveniente da pecore affette solo da scrapie e sacrificati a 28 mesi pi non avevano PrP^{Sc} sia nel SNC sia nel SLR.

Questi risultati indicano che il latte di pecore ARQ/ARQ con scrapie clinica e mastite linfo-follicolare contribuisce alla trasmissione della malattia.

Parole chiave: scrapie, latte, prione, infettività.

PRION INFECTIVITY IN MILK FROM ARQ/ARQ SHEEP WITH SCRAPIE AND MAEDI-VISNA VIRUS MASTITIS

Scrapie in sheep is characterized by the deposition of misfolded and aggregated prion protein (PrP^{Sc}) in the central nervous system (CNS) and within the lymphoreticular system (LRS). PrP^{Sc} was shown to accumulate in organs beyond the CNS and the LRS when lymphofollicular or granulomatous inflammation was also present.

Our aim was to determine whether ectopic PrP^{Sc} accumulation in the inflamed mammary gland of sheep with scrapie results in infectious prion secretion into the milk.

We fed approximately 1.1 - 2.1 L of milk from sheep with lymphofollicular mastitis and clinical scrapie to each of 8 ARQ/ARQ lambs derived from scrapie-free flocks. The milk donor sheep had been previously inoculated with Maedi-Visna virus (MVV) intratracheally and intravenously and scrapie brain homogenate orally. In addition, 3 ARQ/ARQ lambs were fed approximately 1.4 - 1.7 L of milk from ARQ/ARQ sheep that had been experimentally infected with only scrapie.

Four lambs which had received milk from sheep with mastitis and scrapie developed clinical signs of scrapie 23 to 28 months post-inoculation. Of the remaining 4 clinically healthy lamb from this group 2 were found to have PrP^{Sc} in brain and tonsil while the other 2, which were sacrificed for a cause unrelated to scrapie, had no PrP^{Sc} in nervous and lymphoid tissues. The lambs which had received milk from sheep affected only with scrapie were found scrapie-free after 28 months post- inoculation.

These results indicate that milk from ARQ/ARQ sheep with clinical scrapie and lymphofollicular mastitis contributes to scrapie transmission.

Key words: scrapie, milk, prion, infectivity.

INDAGINE QUALI-QUANTITATIVA SULLE CELLULE FOLLICOLARI DENDRITICHE RESIDENTI NELLE PLACCHE DEL PEYER ILEALI IN OVINI DI RAZZA SARDA

Marruchella Giuseppe¹, Ligios Ciriaco², Di Guardo Giovanni¹

¹ *Università degli Studi di Teramo, Dipartimento di Scienze Biomediche Comparete, Piazza Aldo Moro 45, 64100, Teramo;* ² *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, via Vienna 2, 07100, Sassari.*

Le placche del Peyer (PP) svolgono un ruolo chiave nella patogenesi della scrapie ovina. La PrP^{Sc} si accumula precocemente nelle PP, in corrispondenza di macrofagi e cellule follicolari dendritiche (FDC). Nei ruminanti, le PP ileali fungono da organi linfatici primari e vanno incontro ad involuzione al raggiungimento della maturità sessuale.

Nel presente lavoro sono state valutate quali-quantitativamente le FDC residenti nelle PP ileali in relazione all'età, al genotipo ed all'infezione sostenuta dall'agente della scrapie in ovini di razza Sarda. Sono stati studiati 30 animali: 12 agnelli, 12 adulti e 6 ovini affetti da scrapie naturale. Le FDC sono state messe in evidenza in immunostochimica ed immunofluorescenza indiretta. La quantificazione delle FDC è stata eseguita mediante analisi di immagine e i dati ottenuti sono stati sottoposti ad elaborazione statistica.

Il numero medio di follicoli linfatici per sezione tissutale è stato pari a 15 negli adulti e a 65 negli agnelli. La trama delle FDC è risultata più fitta e significativamente più estesa negli agnelli, i cui follicoli mostravano costantemente una rete di FDC che giungeva a ridosso dei vasi linfatici e della dome area. Negli adulti circa 1/3 dei follicoli mancava di una trama di FDC chiaramente visibile, mentre nei restanti casi le FDC disegnavano una rete meno estesa e dall'aspetto più "grossolano". Il genotipo e la presenza di depositi di PrP^{Sc} non influenzavano significativamente la distribuzione delle FDC. Non era altresì possibile rilevare la presenza di FDC nel contesto dei numerosi microgranulomi osservati in sede intra-follicolare. Da notare che le FDC condividono alcuni antigeni con le cellule enterogliali e con le fibre nervose che decorrono nei villi e a ridosso dell'epitelio follicolo-associato, pure colonizzati dall'agente della scrapie.

L'involuzione età-dipendente delle PP ileali e le contestuali modificazioni a carico delle FDC potrebbero giustificare, infine, la ridotta suscettibilità degli ovini adulti nei confronti della scrapie a seguito d'infezione per os.

Parole chiave: ovini, scrapie, placche del Peyer, cellule follicolari dendritiche.

QUALI-QUANTITATIVE INVESTIGATION ON FOLLICULAR DENDRITIC CELLS RESIDING WITHIN ILEAL PEYER'S PATCHES OF SARDA BREED OVINES

Peyer's patches (PPs) play a key role in sheep scrapie infection's pathogenesis. PrP^{Sc} early accumulates within PP follicles and, particularly, within macrophages and follicular dendritic cells (FDCs). In ruminants, ileal PPs functions as a primary lymphoid tissue, undergoing involution at sexual maturity.

The present study was aimed at quali-quantitatively evaluating FDCs residing within ileal PPs in Sarda breed sheep, taking into account the following variables: age, PrP genotype and scrapie infection. In total, 12 scrapie-free lambs, 12 scrapie-free sheep and 6 scrapie-affected ovines were investigated. FDCs were immunohistochemically detected and quantified by image analysis; statistical analysis was also performed.

Follicle number ranged from 15 in adult sheep to 65 in lambs. The FDC network was significantly more dense and wider in lambs than in adults, independently from PrP genotype and PrP^{Sc} deposition. Intra-follicular microgranulomas lacked FDCs. Enteroglia and nerve fibres running along intestinal villi and beneath follicle-associated epithelium also showed specific immunolabelling.

In conclusion, age-related ileal PP involution and FDC network reduction could modulate host's resistance/susceptibility to oral scrapie infection.

Key words: sheep, scrapie, Peyer's patches, follicular dendritic cells.

ALTERAZIONI EMATOLOGICHE IN VITELLI DA CARNE BIANCA CON “POLMONI VERDI”

Giori Luca¹, Stella Simone², Vandoni Stefano², Sgoifo Rossi Carlo Angelo², Enrico Radaelli³,
Giordano Alessia¹

¹ Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Sezione di Patologia Generale e Parassitologia, Facoltà di Medicina Veterinaria, Milano. ² Dipartimento di Scienze e Tecnologie Veterinarie per la Sicurezza Alimentare, Facoltà di Medicina Veterinaria, Milano.

³ Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Sezione di Anatomia Patologica e Patologia Aviare, Facoltà di Medicina Veterinaria, Milano.

Durante le scorse estati è stata rilevata, negli allevamenti di vitelli a carne bianca della Pianura Padana, una notevole frequenza di polmoniti interstiziali eosinofile che sembrano presentare peculiarità rispetto a quelle finora segnalate. Precedenti indagini hanno escluso la presenza di parassiti, miceti e di possibili agenti (*Micropolyspora phaeni*) associati a queste forme.

Questo lavoro s’inserisce in un progetto più ampio che ha lo scopo di meglio caratterizzare questa forma di “polmone verde” che sembra presentare peculiarità rispetto a quelle finora segnalate, indagando l’eventuale coinvolgimento di alterazioni ematologiche o di fattori ambientali.

Nel periodo aprile-luglio 2009 sono stati eseguiti esami copromicroscopici e emocromocitometrici mensili da tre gruppi di animali (A1: n=20; E1: n=24; E2: n=29) provenienti dagli allevamenti sopra citati e da 12 vitelli di un’azienda geograficamente distante, con la stessa gestione ma che non ha mai registrato lesioni al macello (controllo negativo). Sono state inoltre valutate temperatura e umidità ambientali e eseguite analisi micologiche di aria, acqua e alimenti.

Nei soli gruppi E1 ed E2 si rileva un aumento di eosinofili e linfociti in luglio. Rispetto ai controlli, tali gruppi mostrano valori inferiori di linfociti a maggio e valori superiori di eosinofili, monociti e, solo in E2, di neutrofili a luglio. Le analisi ambientali non hanno rilevato potenziali patogeni.

La temperatura è risultata significativamente più alta nel periodo giugno-luglio rispetto a aprile-maggio, mentre non si sono registrate differenze mensili del tasso di umidità. Nell’intero periodo di osservazione, l’umidità media nell’allevamento di controllo è risultata significativamente inferiore a quella degli altri gruppi

Tali risultati evidenziano un coinvolgimento sistemico con attivazione dell’eosinopoiesi, ma non chiariscono l’eziologia probabilmente multifattoriale delle lesioni, la quale sembra però associata a condizioni di elevata umidità.

Parole chiave: polmone verde, ipereosinofilia, vitelli.

INTRODUZIONE

Negli ultimi due anni, in un impianto di macellazione piemontese, il controllo ispettivo veterinario ha registrato, durante i mesi più caldi, un elevato numero di lesioni polmonari affini in vitelli a carne bianca provenienti da alcuni allevamenti, localizzati nella bassa Pianura Padana.

Dal punto di vista anatomo-patologico, sono stati riscontrati edema polmonare localizzato e lesioni parenchimali focali, singole o più raramente multiple, che si distribuivano sulla superficie dorso-caudale dei polmoni che talvolta si presentavano aumentati di volume e di consistenza elastica. A livello di setti interlobulari si osservava un'infiltrazione verdastra talvolta estesa alle sierose e più raramente al sottocute. Nella maggior parte dei casi, la diagnosi istologica inquadrava le lesioni come forme di polmonite interstiziale eosinofila acuta/subacuta, individuando essudazione seroproteinacea, infiltrazione eosinofila ed ipertrofia mesoteliale reattiva a carico degli spazi subpleurici (Figura 1) ed edema, iperemia, fibroangioplasia, massiva infiltrazione eosinofila con marcata ipertrofia dell'intima e media delle arteriole intralesive, a livello interlobulare (Figura 2).

Sebbene clinicamente non fosse segnalato alcun sintomo tale da pregiudicare le performance produttive degli animali colpiti, le alterazioni macroscopiche erano responsabili del deprezzamento della corata e talvolta della carcassa. Il Dipartimento di Scienze e Tecnologie Veterinarie per la Sicurezza Alimentare (VSA) di Milano, avvalendosi anche della collaborazione delle sezioni di Anatomia Patologica e di Patologia Generale e Parassitologia del Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria (DIPAV), ha messo a punto un progetto di ricerca rivolto, mediante un'indagine a tutto campo, ad individuare i fattori coinvolti nel determinismo di queste alterazioni eosinofiliche che appaiono peculiari rispetto a quelle finora segnalate.

MATERIALI E METODI

Sono stati selezionati due allevamenti (A1 ed E) che nelle scorse annate avevano rilevato un'elevata frequenza delle sopradescritte lesioni polmonari. Sono stati monitorati 20 soggetti nell'allevamento A1 e 53 nell'allevamento E suddivisi in due stalle limitrofe (E1=24 ed E2=29). Il gruppo controllo (C) era costituito da

12 vitelli allevati in un'azienda, nella quale non fosse mai stata segnalata questa problematica, collocata in una area geograficamente distante ma con medesimo management delle aziende studio.

Il progetto sperimentale si è sviluppato in tre fasi consecutive:

1. **Campionamenti mensili**, da aprile ad agosto 2009, secondo il seguente piano di analisi:
 - Esame copromicroscopico di ogni soggetto;
 - Esame emocromocitometrico per ogni soggetto;
 - Campionamento di aria in più punti dell'allevamento, per la rilevazione della presenza di ammoniaca, ricerca di miceti ed identificazione delle muffe isolate;
 - Campionamento degli alimenti somministrati agli animali;
 - Registrazione delle condizioni di temperatura e umidità;
 - Registrazione di tutti gli interventi profilattici-terapeutici effettuati sugli animali.
2. **Monitoraggio**, in sede di macellazione, della eventuale presenza di lesioni riferibili a "polmone verde". La valutazione anatomo-patologica è stata effettuata sulle corate della totalità dei capi presenti in tutti i capannoni considerati, per rilevare la frequenza dell'alterazione e la sua distribuzione in allevamento. I capi sottoposti a sperimentazione sono stati macellati separatamente per poter eseguire gli approfondimenti diagnostici necessari;
3. Da un numero selezionato di animali si è provveduto al prelievo di eventuali organi colpiti dalla patologia per i necessari **approfondimenti di ordine istologico e biomolecolare**.

La sezione di Patologia Generale si è occupata dell'esecuzione degli emocromi e della valutazione dei risultati ottenuti in relazione alla temperatura e all'umidità registrate nei 5 giorni precedenti il prelievo. Il sangue, in K₃EDTA, è stato trasportato al Laboratorio Centralizzato dell'Ospedale Veterinario di Lodi e processato nell'arco di 24 ore con contaglobuli automatico laser (ADVIA 120, Siemens diagnostics). La formula leucocitaria è stata effettuata su striscio ematico dopo colorazione tipo-Romanowski (Hemacolor).

Il confronto tra i dati ematologici dei soggetti nei diversi gruppi e nei diversi mesi, e la correlazione

con temperatura ed umidità sono stati valutati attraverso l'impiego di test statistici non parametrici quali Kruskal-Wallis e Friedman.

RISULTATI

Tutti gli animali oggetto dello studio hanno raggiunto il peso corporeo pre-macellazione stabilito, senza evidenti ritardi nei tempi di allevamento. Tutti i soggetti appartenenti all'allevamento E (E1 ed E2), macellati ad agosto, hanno manifestato macroscopicamente le lesioni polmonari ricercate. Contrariamente l'incidenza delle alterazioni è stata del 20% e dello 0% rispettivamente nel gruppo A1 (4/20) e C (0/12).

Per indagare l'eventuale coinvolgimento sistemico della patologia responsabile delle lesioni polmonari eosinofile abbiamo confrontato la variazione del numero assoluto degli eosinofili ematici nei diversi mesi per ogni gruppo (grafico 1) e successivamente nei diversi gruppi in ogni mese (grafico 2).

Nel grafico 1 si osserva come, nei gruppi E1 ed E2, il numero degli eosinofili sia significativamente più elevato in luglio rispetto agli altri mesi, mentre nel gruppo A1, dove il prelievo di luglio è mancante, non si osservano differenze statisticamente significative tra i mesi. Nel gruppo C una differenza statisticamente significativa è visibile nel mese di maggio ma il numero degli eosinofili è comunque all'interno dei range di normalità per la specie bovina¹. Anche nel grafico 2 risulta evidente il significativo aumento del numero totale degli eosinofili nel gruppo E1 ed E2, in luglio.

Del tutto trascurabili risultavano le valutazioni statistiche ricercate nelle altre popolazioni leucocitarie.

La temperatura è risultata significativamente più elevata nel periodo giugno-luglio rispetto ad aprile-maggio (grafico 3) mentre non si sono registrate differenze mensili del tasso di umidità. Nell'intero periodo di osservazione, l'umidità media nell'allevamento C è però risultata significativamente inferiore a quella degli altri gruppi (grafico 4). Le analisi ambientali non hanno rilevato la presenza di patogeni.

DISCUSSIONE

Fino a qualche tempo fa, ogni sindrome o processo flogistico polmonare del bovino che coinvolgesse in modo rilevante le strutture di sostegno parenchimali (setti alveolari, connettivo peribronchiale-vasale, setti interlobulari e spazio subpleurico) presentando istologicamente edema,

enfisema e fibrosi interstiziale, membrane ialine e abbondanti infiltrati cellulari in assenza di un evidente essudato, veniva classificata come Atypical Interstitial Pneumonia (AIP).² In realtà, questo termine, puramente clinico e ben radicato in letteratura veterinaria, è stato coniato per descrivere quadri di polmonite bovina acuta o cronica non classificabili come forme classiche per mancanza di essudato o tosse produttiva.

Studi patogenetici sperimentali e di campo hanno successivamente dimostrato che la maggior parte delle sindromi bovine classificate precedentemente tra le AIP hanno cause e patogenesi eterogenee, come le pneumopatie interstiziali ad impronta eosinofila riscontrabili nella cosiddetta ABPE (Acute Bovine Pulmonary Edema and Emphysema)³, nella EAA (Extrinsic Allergic Alveolitis)⁴ e nelle parassitosi polmonari. Le indagini ematologiche effettuate hanno evidenziato un coinvolgimento sistemico con attivazione dell'eosinopoiesi, anche se la valutazione complessiva delle analisi effettuate finora ci ha permesso di escludere alcune diagnosi differenziali, senza peraltro permetterci di giungere ad una specifica definizione eziologica del fenomeno clinico-patologico osservato.

Ad esempio, l'assenza di focolai necrotico-emorragici in rapporto con tragitti e localizzazioni nel parenchima polmonare, ed il mancato riscontro di parassiti adulti o allo stadio larvale ci ha permesso di escludere l'ipotesi elmintica peraltro improbabile in un allevamento intensivo. Analogamente, abbiamo escluso tossicosi endogene legate all'assunzione di elevate quantità di triptofano attraverso l'alimentazione con foraggio fresco².

Nonostante i campionamenti mensili di aria ed alimenti non abbiano evidenziato eccessiva polverosità delle stalle né la presenza di spore fungine (*Saccharopolyspora rectivirgula*, già *Micropolyspora faeni*) o batteri, i quadri istologici riscontrati potrebbero essere morfologicamente riferibili a iniziali fenomeni immunopatologici (ipersensibilità di I e- o III tipo).

In effetti le stimolazioni antigeniche in grado di scatenare e sostenere fenomeni di polmonite allergica nell'allevamento bovino intensivo possono essere numerose ed eterogenee⁵: dalla somministrazione di farmaci e vaccini, alle infezioni respiratorie virali tra cui BRSV^{6,7} sebbene l'esame batteriologico e virologico (effettuati sui campioni lesivi) non abbia dimostrato il coinvolgimento di patogeni respiratori.

Dai risultati delle nostre analisi però, si evidenzia che tra le possibili cause, considerate

singolarmente o più verosimilmente insieme, le condizioni di elevata umidità sembrano favorire l'insorgenza diffusa della lesione, condizione che tende a dare spiegazione anche della transitorietà della patologia, dal momento che soggetti allevati contemporaneamente agli animali considerati nello studio, ma macellati in autunno, non presentavano più lesioni di alcun tipo.

BIBLIOGRAFIA

1. George JW et al. Vet Clin Path. 2010;39(2):138-48.

2. McGavin MD et al. Patologia Sistemica Veterinaria. 4th ed. 2007:221-225.
 3. Loneragan GH et al. Am J Vet Res. 2001;62(10):1525-30.
 4. Gershwin LJ et al. Am J Vet Res. 1984;45(10):2135-42.
 5. Woolums AR et al. Compend Contin Educ Pract Vet. 2001;23:S86-S93.
 6. Antonis AF et al. J Virol. 2003;77(22):12067-73.
 7. Gershwin LJ et al. Int Arch Allergy Immunol. 1994;104(1):79-91.

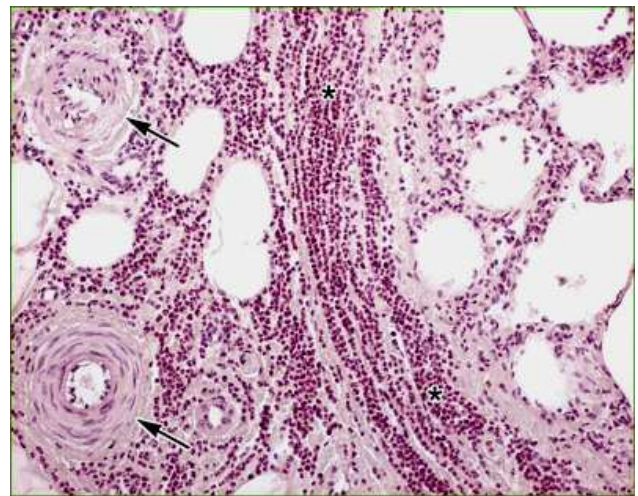
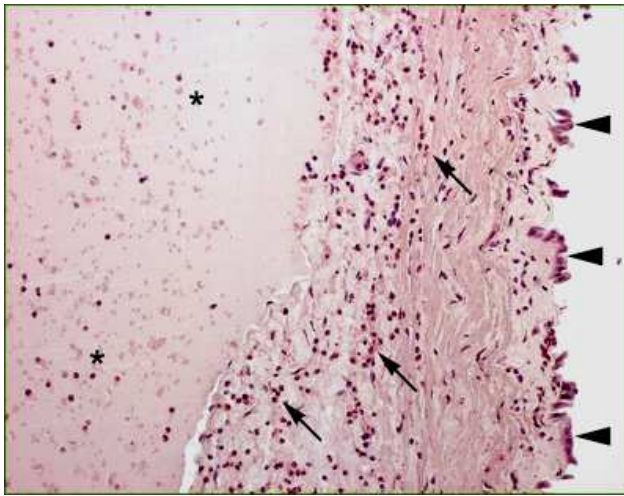


Figura 1 Spazio subpleurico: polmonite interstiziale eosinofila acuta/subacuta, essudazione seroproteinaica (*), infiltrazione eosinofila (freccie) ed ipertrofia mesoteliale reattiva (punta di freccia).

Figura 2 Zona interlobulare: polmonite interstiziale eosinofila acuta/subacuta, edema, iperemia, fibroangioplasia, massiva infiltrazione eosinofila (*), marcata ipertrofia dell'intima e media delle arteriole intralesive (freccie).

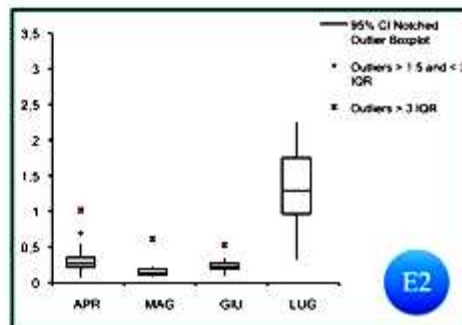
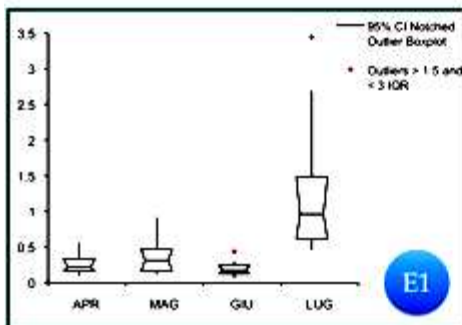
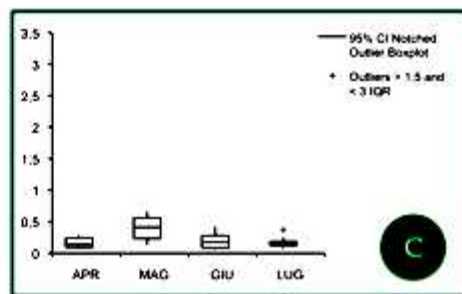
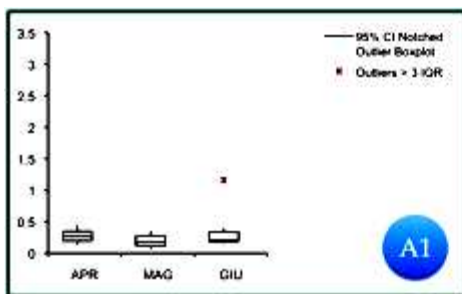


Grafico 1 Confronto tra valori medi in numero assoluto di eosinofili ematici ($X10^3/\mu l$) tra mesi di osservazione per i diversi allevamenti.

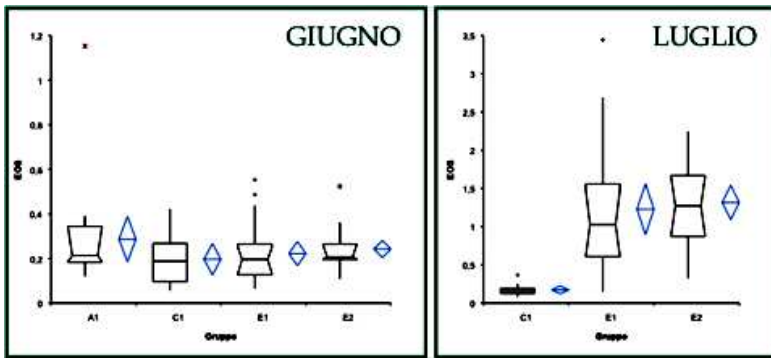


Grafico 2 Confronto tra valori medi in numero assoluto di eosinofili ematici ($X10^3/\mu\text{l}$) tra i diversi allevamenti, nei mesi più caldi (giugno e luglio).

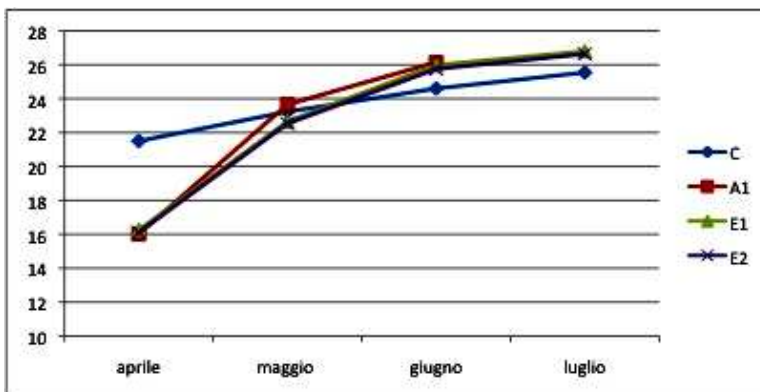


Grafico 3 Temperatura media per allevamento da aprile a luglio.

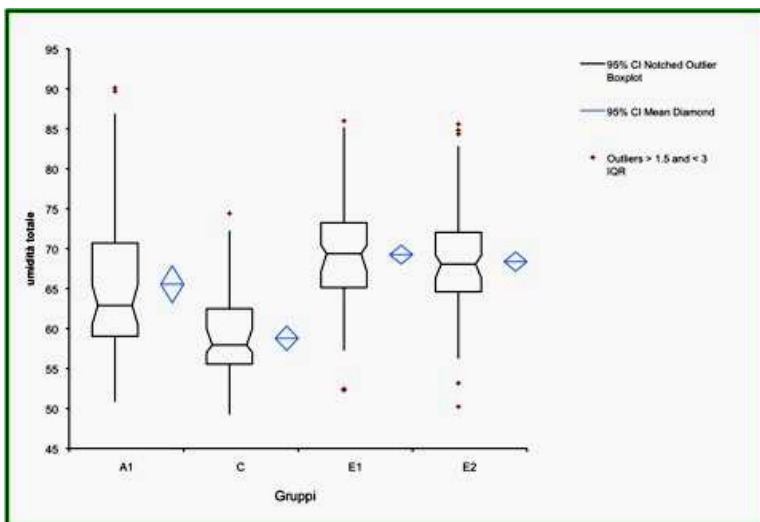


Grafico 4 Confronto medie umidità nell'intero periodo di osservazione (aprile-luglio) per allevamento, in percentuale.

HAEMATOLOGICAL CHANGES IN BEEF CALVES WITH “GREEN LUNGS”

During the latest summer seasons we recorded an increase of eosinophilic interstitial pneumonia in beef calves from Padan plane. The lesions are characterized by focal/multifocal greenish areas on lung dorsal surface, serosae and subcutis. Histopathological and environmental investigations excluded the presence of parasites, fungi and possible associated agents (*Micropolyspora phaeni*). This work is aimed to investigate hematological changes and/or environmental factors possibly involved in this “green lung” lesions. From April to July 2009, monthly CBC and copromicroscopy from animals belonging to 3 groups (A1: n=20; E1: n=24; E2: n=29) from the affected farms were done. A control group (C: n=12) from a farm geographically distant, with the same management has been included. Environmental temperature and humidity were registered and mycological analyses of air, water and food samples were performed.

Eosinophils and lymphocytes increased in July only in groups E1 and E2. These groups had lower lymphocytes than C in May and higher eosinophils, monocytes and, only for E2, neutrophils in July. No

environmental pathogens were identified. Humidity was lower in farm C than in the other farms, but not temperature.

Results suggest a systemic involvement with activation of eosinopoiesis. Etiology of the lesions, possibly multifactorial, is still not clear but it seems connected by a high humidity rate.

Key words: green lung, hypereosinophilia, calves.

VALUTAZIONE DELLA CONTA DIFFERENZIALE DELLE CELLULE DEL LATTE IN RELAZIONE ALLO STATO SANITARIO DELLA MAMMELLA

Pilla Rachel¹, Asion Debbie², Schwarz Daniel³, Piccinini Renata¹

¹ Dipartimento di Patologia Animale Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Università degli Studi di Milano, via Celoria 10 - 20133 Milano, Italia. ² Advanced Animal Diagnostics, 1912 Hwy 54 East Suite 205 Durham, NC 27713, USA. ³ Department of Animal Sciences, Georg-August-University of Göttingen, Burckhardtweg 2 - 37077 Göttingen, Germania

La conta delle cellule somatiche è usata correntemente, nell'allevamento della vacca da latte, come indicatore di mastite. D'altra parte, la conta differenziale delle cellule (CDC) è stata indicata come un metodo più accurato per l'indagine dello stato sanitario della mammella. Tuttavia, il dibattito riguardante il profilo cellulare di un latte sano è ancora aperto. In questo studio trasversale si esamina la CDC del latte proveniente da 188 quarti mammari di 50 vacche in tre allevamenti del comprensorio lombardo. Due di questi presentavano infezioni da diversi ceppi di *Staphylococcus aureus*, mentre nel terzo allevamento non erano presenti patogeni contagiosi. Sui campioni di latte è stato effettuato l'esame cito-batterologico, come indicato dal NMC. Inoltre, sulle cellule lavate in PBS e colorate con May Grünwald-Giemsa, sono state valutate le percentuali di linfociti (L), macrofagi (M), cellule polimorfonucleate (PMN) e i loro rapporti. I risultati batteriologici hanno confermato l'assenza di patogeni contagiosi nell'allevamento A e la presenza di *S. aureus* negli altri due allevamenti. In particolare, l'azienda B era caratterizzata da un ceppo coagulasi-negativo. In tutte le aziende erano presenti quarti mammari sani e affetti da mastite subclinica, come evidenziato dalla conta delle cellule somatiche (CCS). L'analisi dei dati citologici ha mostrato una marcata differenza nei profili cellulari degli allevamenti, pur in presenza di valori simili di SCC, indicando come la risposta immunitaria della ghiandola mammaria sia molto diversa fra gli allevamenti. Ulteriori studi saranno necessari per chiarire se tali differenze siano ascrivibili alla genetica della mandria, ai patogeni prevalenti, o all'interazione tra questi fattori, anche nell'ottica di un'evoluzione della metodica tradizionale di conteggio delle cellule somatiche.

Parole chiave: mastite, conta differenziale delle cellule, *Staphylococcus aureus*.

EVALUATION OF MILK DIFFERENTIAL CELL COUNT IN RELATION TO MAMMARY GLAND HEALTH STATUS IN THE DAIRY COW

In the dairy herd, somatic cell count (SCC) is largely used as an indicator of mastitis. Differential cell count (DCC) has been indicated as a more accurate method for mastitis identification. Nevertheless, the debate is still open about the cellular profile in healthy milk. This cross-sectional study explored DCC of 188 quarter milk samples from 50 cows in 3 dairy herds in Lombardia region. Two of them were affected by *Staphylococcus aureus* intramammary infections, while the other herd was free from contagious pathogens. Somatic cell counts and bacteriological examination were performed following NMC guidelines. Milk cells were then washed in PBS and May Grünwald-Giemsa stained, to assess relative percents of lymphocytes (L), macrophages (M), polymorphonuclear cells (PMN) and their ratios. Results confirmed that herd A was free from contagious pathogens, while herd B and C were infected by *S. aureus*. Particularly, herd B was characterized by a coagulase-negative strain. All herds showed the presence of healthy quarters and subclinical mastitis, as evidenced by SCC. Cellular profiles demonstrated clear differences among herd, even in the presence of similar SCC. Our results suggest that mammary immune response can be very different from herd to herd, based on the genetic background, on the prevalent aetiologic agent or on both factors. Further studies are needed to investigate these aspects, also to develop a more accurate method to evaluate milk somatic cells.

Key words: mastitis, differential cell count, *Staphylococcus aureus*.

VALUTAZIONE CITOMETRICA DELL'ESPRESSIONE DI INTEGRINE IN RELAZIONE ALLO STATO METABOLICO IN BOVINE NEL PERIPARTO

Gelain Maria Elena, Malvisi Michela, Piccinini Renata, Zecconi Alfonso, Comazzi Stefano

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

Il periparto, periodo critico della vita produttiva della bovina da latte, è caratterizzato da eventi stressanti come il cambio di alimentazione, il parto e l'avvio della lattazione che, attraverso modifiche metaboliche e ormonali, influiscono sulla comparsa di dismetabolie e mastiti cliniche da microrganismi ambientali. Scopo del lavoro è analizzare il rapporto tra stato immunitario e condizioni metaboliche della bovina nel periparto, valutando le variazioni di espressione delle integrine CD11b, CD18 e di CD14 sui leucociti circolanti e indagando la possibile correlazione con i livelli di acidi grassi non esterificati (NEFA) e β -idrossi-buttirato (BHB). Sono stati analizzati prelievi di sangue di 8 bovine di razza frisona provenienti da due allevamenti. Da ciascuna bovina sono stati prelevati 12 campioni a partire da 7 giorni prima della messa in asciutta fino a 28 giorni post-parto, sui quali sono stati effettuati l'esame emocromocitometrico, la determinazione dei livelli di NEFA e BHB e di espressione di CD11b, CD18 e CD14 su polimorfonucleati (PMN) e monociti. Le bovine non manifestavano segni clinici ascrivibili a patologie metaboliche e l'analisi microbiologica del latte non ha evidenziato la presenza di patogeni. Nel primo allevamento, i valori di BHB e NEFA erano significativamente più bassi, mentre i livelli di espressione di CD11b nei PMN e CD14 nei monociti risultavano inferiori nel secondo allevamento. Nessuna correlazione significativa era presente tra i valori degli antigeni di superficie e i parametri metabolici. Nel primo allevamento, i livelli di BHB e NEFA erano pressoché costanti nel pre- e post-parto e il rapporto tra espressione di CD11b e di CD18 aumentava nel post-parto, sia nei monociti sia nei PMN. Nel secondo allevamento, BHB e NEFA aumentavano significativamente nel post-partum e il rapporto CD11b/CD18 aumentava solo nei monociti. I risultati, seppur preliminari, sembrerebbero confermare la presenza di dismetabolie subcliniche e variazioni nella funzionalità leucocitaria, in funzione del differente management aziendale.

Parole chiave: bovine da latte, periparto, integrine, NEFA, β -idrossi-buttirato.

INTRODUZIONE

Il periparto, periodo critico della vita produttiva della bovina da latte, è caratterizzato da eventi stressanti come il cambio di ambiente, di alimentazione, il parto e l'avvio della lattazione i quali, attraverso importanti modifiche metaboliche e ormonali, influiscono sul verificarsi di patologie metaboliche e infiammatorie con ripercussioni sulla produzione^{1,2}.

La maggiore incidenza di patologie infiammatorie nel periparto è stata imputata all'immunosoppressione che caratterizza questa fase^{1,3,4} le cui cause sono oggetto di continuo studio, in quanto, molto probabilmente, si tratta del risultato della contemporanea azione di diverse variazioni fisiologiche⁴, talvolta ulteriormente complicate dalla comparsa di patologie metaboliche. Gli scompensi metabolici che possono comparire nelle bovine in transizione sono infatti considerati fattori predisponenti e aggravanti l'immunosoppressione, soprattutto gli elevati livelli di BHB e NEFA plasmatici, i quali influirebbero negativamente sull'attività di monociti e PMN⁵. La correlazione tra scompensi metabolici e funzionalità leucocitaria è stata indagata in diversi studi, in particolare, l'alterazione delle attività di diapedesi, fagocitosi e *killing* dei PMN e la produzione di citochine dei linfociti. Nella maggior parte dei casi però si tratta di studi in vitro o di valutazione della riposta leucocitaria dopo infezioni sperimentali su animali provenienti da allevamenti sperimentali^{5,6}.

SCOPO DEL LAVORO

Scopo del lavoro è stato indagare le variazioni di espressione delle integrine CD11b e del CD18 sui PMN e monociti circolanti e CD14, attraverso analisi citofluorimetrica, e i livelli di alcuni parametri metabolici come NEFA e BHB durante il periparto, in bovine provenienti da due allevamenti commerciali, per verificare il rapporto tra stato immunitario e condizioni metaboliche e valutando l'influenza del management aziendale sulle condizioni di salute.

MATERIALI E METODI

Sono stati analizzati prelievi di sangue di 8 bovine di razza frisona provenienti da due allevamenti (5 animali dal primo allevamento, 3 dal secondo allevamento). Da ciascuna bovina sono stati prelevati 12 campioni, da 7 giorni prima della messa in asciutta fino a 28 giorni post-parto, sui i

quali sono stati effettuati l'esame emocromocitometrico con conta globuli automatica (Sysmex XT-2000iV, Kobe, Japan) e la determinazione della concentrazioni di NEFA e (BHB) mediante kit commerciale (3-idrossibutirrato RANBUT e Not Esterified Fat Acid, RANDOX Italia, Roma). In concomitanza con i prelievi di sangue, sono stati effettuati prelievi di latte per l'esame batteriologico. Sono stati valutati i livelli di espressione delle integrine CD11b (clone CC126, SEROTEC), CD18 (clone CA1.4E9, SEROTEC) e di CD14 (clone VPM65, SEROTEC) mediante citometria a flusso. L'acquisizione è stata effettuata con citofluorimetro FacsCALIBUR BD (Benton Dickinson) e l'analisi dei dati con software specifico CellQuest (Benton Dickinson).

RISULTATI

In tutti gli animali il numero di leucociti totali erano nella norma, con inversione della formula leucocitaria, nei prelievi a cavallo del parto, solo negli animali del secondo allevamento (Fig. 1). I livelli di NEFA e BHB, nel primo allevamento, si mantenevano pressoché sempre all'interno dei range di riferimento (NEFA 0.04-0.8 mmol/L, BHB 0.03-0.3 mmol/L) ed erano significativamente inferiori ai valori registrati nel secondo allevamento ($P=0.002$). I livelli di espressione delle integrine e di CD14 hanno evidenziato una notevole variabilità individuale, senza correlazione con i vari momenti della gravidanza e del post parto né con i parametri metabolici. Una correlazione negativa significativa era invece presente tra i livelli d'espressione del CD11b nei PMN e il loro numero assoluto ($P=0.02$). I livelli di CD11b e CD14 si sono dimostrati significativamente più bassi ($P<0.05$) nel secondo allevamento (Fig. 2). Confrontando l'andamento nei prelievi pre e post-parto risultava evidente come, nel primo allevamento, BHB e NEFA mantenevano livelli pressoché identici. Nel secondo allevamento, al contrario, entrambi gli analiti aumentavano significativamente nel post partum (Fig. 3) (BHB $P=0.003$; NEFA $P=0.000$). L'espressione delle integrine invece non variava tra pre e post-parto. Analizzando il rapporto tra i livelli di espressione del CD11b e del CD18 (CD11b/CD18) si è notato, nel primo allevamento, una tendenza all'aumento nel post parto per aumento del CD11b e riduzione del CD18, sia nei monociti sia nei PMN. Nel secondo allevamento tale situazione si è verificata solo per i monociti, con

un aumento significativo del rapporto CD11b/CD18 nel post-parto (Fig. 4).

DISCUSSIONE

Le bovine da noi prese in esame erano sane, non manifestavano segni clinici ascrivibili a patologie metaboliche e l'analisi microbiologica del latte non aveva evidenziato nessun risultato positivo. La neutrofilia e l'inversione della formula leucocitaria osservata è indicata come la conseguenza tipica della risposta allo stress⁷, in particolare del rilascio di glucocorticoidi, i quali raggiungono un picco in prossimità del parto. Nella nostra esperienza l'inversione della formula leucocitaria era evidente nel secondo allevamento e potrebbe trovare spiegazione nel tipo di gestione degli animali che probabilmente raggiungono livelli di stress più elevati. Diverse cause sono state suggerite per spiegare il calo della risposta immunitaria e la riduzione della funzionalità dei PMN nel periparto e la principale sembra essere i livelli di cortisolo plasmatico che indurrebbe una diminuita espressione di integrine^{8,9}. Parzialmente d'accordo con queste affermazioni appaiono i nostri dati relativi al CD18, mentre per il CD11b, sebbene non siano emerse differenze significative, risulta nel complesso maggiormente espresso dai PMN del primo allevamento, così come il CD14 nei monociti. Come già segnalato¹⁰, l'aumento di espressione del CD11b si osserva nel post-parto, in seguito probabilmente alla maggiore attivazione dei PMN, stimolati da citochine e fattori chemiotattici rilasciati nei siti di infezione anche se si può assistere ad un calo di espressione negli animali stressati, per gli elevati livelli di glucocorticoidi, per i quali si potrebbe proporre una ridotta funzionalità dei neutrofili a causa di una minore espressione della β_2 -integrina¹⁰. Sebbene nei casi da noi presi in esame sia stata osservata una minore espressione del CD11b nel secondo allevamento, nessuna alterazione è stata evidenziata nell'immediato post-parto probabilmente perchè le condizioni di stress da parto non erano del tutto sufficienti a determinare alterazioni gravi delle molecole di adesione. Pochi lavori hanno indagato le variazioni di espressione di CD14 nel periparto⁶, il quale non ha restituito nessun risultato significativo. Il CD14 è un recettore sia legato alla membrana cellulare (mCD14) sia solubile (sCD14); quest'ultimo è indicato come un sistema di controllo dell'attivazione dei PMN dopo stimolazione da LPS¹¹; questi, legandosi al sCD14 non provocherebbero nei monociti il rilascio di

TNF α e la conseguente attivazione dei PMN, come accade normalmente dopo il legame tra LPS e mCD14. La minore espressione di mCD14 nel secondo allevamento, potrebbe essere collegata ad un incremento dell'sCD14 e ad una minore attivazione dei PMN, confermata fra l'altro da livelli più bassi del CD11b.

Alla luce della tendenza alla diminuzione nei livelli di CD18 ed al contemporaneo aumento di CD11b, abbiamo indagato il rapporto tra questi parametri: nel secondo allevamento, a fronte di un aumento statisticamente significativo nei monociti, si evidenziava una diminuzione del rapporto per i PMN. Nessuna variazione significativa è stata osservata per il complesso CD11b/CD18 sui monociti. La riduzione dei macrofagi residenti nel latte osservata in bovine nel periparto non sembra quindi legata alla riduzione dell'espressione delle β_2 -integrine sulla superficie dei monociti⁶.

Al momento, in base alle nostre conoscenze, non sono presenti lavori sul rapporto tra NEFA e BHB e integrine. Ampiamente indagati sono stati però gli effetti di questi parametri sulla funzionalità dei neutrofili, nei quali comprometterebbero chemiotassi, fagocitosi e attività battericida extracellulare⁵. Nella nostra esperienza è stata riscontrata una netta differenza tra i parametri metabolici tra i due allevamenti, con valori di BHB superiori a 1mmol/l e livelli di NEFA significativamente maggiori nel secondo allevamento, che sicuramente possono confermare l'ipotesi di un management lipomobilizzante. La differenza evidenziata tra i due allevamenti può essere ulteriormente confermata dall'osservazione degli stessi parametri nel pre e post parto, durante il quale erano evidenti incrementi decisamente significativi nelle bovine del secondo allevamento. In questo caso, le condizioni metaboliche sfavorevoli potrebbero essere legate alla contemporanea tendenza alla neutrofilia, con una correlazione negativa con l'espressione di CD11b e la diminuzione del rapporto CD11b/CD18.

CONCLUSIONI

I dati da noi rilevati, seppur preliminari, sembrerebbero confermare come molteplici variabili possono favorire l'immunosoppressione post-parto tra i quali gli aspetti metabolici e il management aziendale.

BIBLIOGRAFIA

1. Vangroenweghe F et al. 2005. Domestic Animal Endocrinology 29: 283-293.
2. Burvenich C et al. 2007. Journal of Dairy Science. 90: E39-E54.
3. Singh J. et al. 2008. The Veterinary Journal 175: 301-309.
4. Burvenich C et al. 2003. Veterinary Research 34: 521-64.
5. Grinberg N. et al. 2008. Infection and Immunity 76: 2802-2807.
6. Diez-Fraile A. et al. 2003. Journal of Dairy Science;86(7):2334-42.

7. Jain N.C. Schalm's Veterinary Hematology, 179-196, 1896.
8. Gilbert R.O et al. 1993. Res. Vet. Sci. 55: 15-19.
9. Burton J.L. et al. 1995. Journal of Leukocyte Biology 57: 317-325.
10. Diez-Fraile et al. 2000. Veterinary Immunology and Immunopathology 76: 151-156.
11. Paape M.J et al. 2002. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia 7, 2.

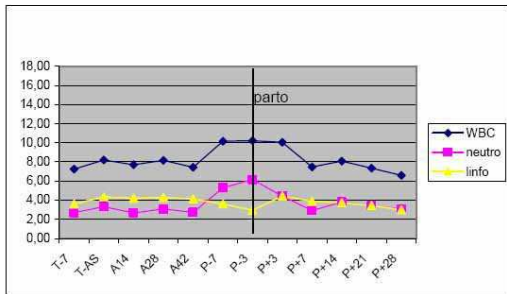
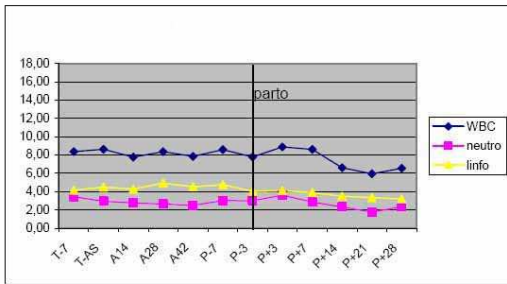


Fig. 1: valori medi di leucociti totali (WBC), neutrofil e linfociti nei due allevamenti durante il periodo di osservazione.

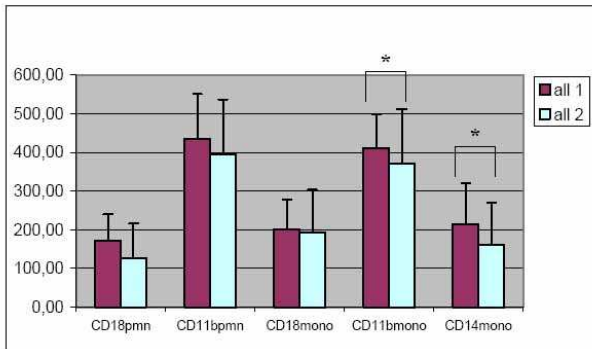


Fig. 2: livelli di espressione di CD18, CD11b e CD14 sulla superficie di granulociti (pmn) e monociti (mono) dei due allevamenti. * $P < 0,05$

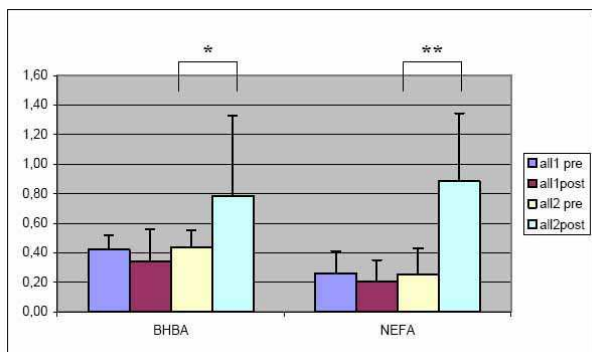


Fig. 3: livelli di BHBA e NEFA nel pre e post parto. ** $P < 0,01$

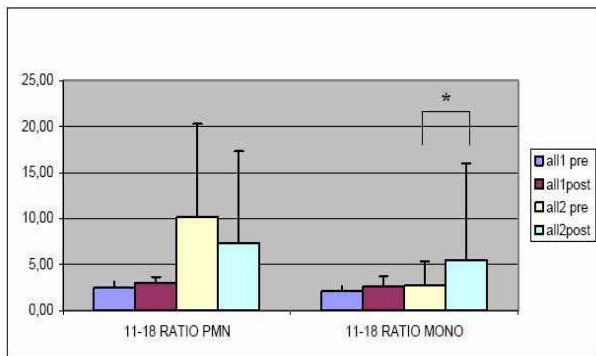


Fig. 4: Valori di CD11b/CD18 ratio nei granulociti (pmn) e monociti (mono) nel pre e post parto. *P<0,05

FLOW CYTOMETRIC EVALUATION OF INTEGRIN EXPRESSION AND CORRELATION WITH METABOLIC STATUS IN TRANSITION DAIRY COWS

Transition period is a critical step for dairy cattle due to variations in metabolic and hormonal status that increase susceptibility to metabolic diseases, induce an impairment in bovine immune system and decrease resistance to infectious disease. Aim of this work is to evaluate the correlation between expression of CD11b, CD18 and CD14 on circulating leukocytes and metabolic parameters such as NEFA and β -hydroxybutyrate (BHB). Eight Holstein cows from two different commercial dairy herds were sampled 12 times, from 7 days before to 28 day after calving. Complete blood cell count, NEFA and BHB analysis, flow cytometric evaluation of integrins were performed. No correlation was found between integrin expression and metabolic parameters. The cows from first herd showed a significant lower NEFA and BHB values, higher CD11b and CD14 expression on granulocytes and monocytes, respectively, and increased CD11b/CD18 ratio in the post-partum period. In the second herd, NEFA and BHB were significant higher after calving, while CD11b/CD18 ratio increased only on monocytes. These preliminary data show that herds with different metabolic status could showed variation in leukocytes antigen expression and confirm the influence of management in bovine health status.

Key words: cattle, drying-off, integrin, NEFA, β -hydroxy-butyrate.

ESPRESSIONE DELLE PROTEINE DI FASE ACUTA NEI PRESTOMACI DI BOVINI SANI

Dilda Francesca^a, Pisani Laura Francesca^a, Restelli Laura^a, Rahman Mizanur Md^{ad}, Modina Silvia^{bc}, Tessaro Irene^b, Sartorelli Paola^{ac}, Lecchi Cristina^a, Cecilianì Fabrizio^{ac}

^a Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, via Celoria 10, 20133 Milano, Italy. ^b Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Scienze Animali, via Celoria 10, 20133 Milano, Italy. ^c CISMA Centro Interdipartimentale di Studi sulla Ghiandola Mammaria, Università degli Studi di Milano, via Celoria 10, 20133 Milano, Italy. ^d Chittagong Veterinary and Animal Sciences University, Department of Medicine & Surgery, Zakir Hossain Road, Chittagong 4202, Bangladesh.

Le proteine di fase acuta (APP) sono proteine sieriche coinvolte nella risposta sistemica all'inflammatione, prodotte principalmente dal fegato, ma possono essere espresse anche in sede extra-epatica.

Lo scopo di questo lavoro è determinare la presenza dell'attività di sintesi delle maggiori APP del bovino quali aptoglobina (Hp), siero amiloide A (SAA), LPS-binding protein (LBP) e α_1 -glicoproteina acida (AGP) a livello delle mucose dei prestomaci e dell'abomaso di bovini sani, per indagare il loro potenziale ruolo nell'immunità locale.

La presenza dei trascritti corrispondenti alle proteine d'interesse è stata determinata mediante PCR qualitativa e quantificata mediante PCR Real-Time. L'effettiva presenza delle proteine nelle mucose è stata verificata mediante Western Blot (WB) ed immunistoichimica.

Gli esperimenti mostrano una maggiore espressione di SAA e Hp nell'abomaso, di LBP nel reticolo e di AGP nel rumine, benchè i livelli siano inferiori al fegato. Il WB ha confermato che le proteine vengono espresse in tutti i prestomaci e l'immunistoichimica ha permesso d'identificare la LBP lungo tutto l'epitelio dei prestomaci e la Hp negli endoteli di tutti i prestomaci e nell'epitelio ghiandolare dell'abomaso.

Quanto descritto conferma che, in condizioni fisiologiche, le APP vengono prodotte anche in sede extra-epatica. Inoltre le indagini dimostrano come a livello dei prestomaci sia presente un'attività di sintesi proteica derivante dall'animale stesso e non soltanto dalla flora microbica. La dimostrazione che la mucosa dei prestomaci è in grado di sintetizzare ed esprimere alcune APP è importante perché esse agiscono come molecole immunomodulatorie del tratto gastroenterico e possono contribuire a mantenere l'omeostasi locale, riducendo il danno tissutale.

Parole chiave: proteine di fase acuta, prestomaci, bovino.

INTRODUZIONE

Le proteine di fase acuta (APP) sono proteine coinvolte nella risposta sistemica o locale all'infiammazione (*Gabay and Kushner, 1999*). Vengono prodotte principalmente dal fegato, a seguito di stimolazione da parte di citochine pro-infiammatorie quali IL-1, IL-6 e TNF- α (*Gruys et al., 2005*). In molti mammiferi, è stata evidenziata una loro espressione in sede extra-epatica (*Uhlar and Whitehead, 1999; Vreugdenhil et al., 1999; Upragarin et al., 2005; Lecchi et al., 2008a; Rahman et al., 2010*). Queste proteine intervengono nell'opsonizzazione, nell'attivazione del complemento, nella rimozione dell'emoglobina libera e dei radicali liberi e nella modulazione della risposta immunitaria dell'ospite, attivando direttamente modulatori che intervengono nella produzione d'integrine (*Hatanaka et al., 2004; Bingle and Craven, 2004; Sandri et al., 2008; Lecchi et al., 2008b; Martínez Cordero et al., 2008; Zweigner et al., 2008; Sander et al., 2010*).

La mucosa gastrointestinale dei ruminanti è costantemente in contatto con la flora microbica presente nei prestomaci. Un monostrato di cellule epiteliali intestinali ricopre la superficie della mucosa digerente impedendo, così, l'incontrollata disseminazione di patogeni nei tessuti dell'ospite. La prima linea di difesa dell'ospite contro gli stimoli provenienti da quest'ambiente è determinata dai peptidi antimicrobici (AMP), presenti nelle secrezioni che ricoprono la superficie mucosale, come riportato in alcuni studi effettuati in umana (*Dommett et al., 2005*). Una volta rotta la barriera mucosale, la presenza di un potenziale patogeno stimola l'attivazione delle cellule coinvolte nella risposta immunitaria innata, quali neutrofili, monociti/macrofagi. Batteri e altri microrganismi vengono riconosciuti da recettori pattern recognition receptors (PRR) come i Toll-Like receptors (TLR) (*Bottazzi et al., 2010*), che legano le strutture più conservate molto prima di riconoscerlo come pathogen-associated molecular patterns (PAMP) o microbe-associated molecular patterns (MAPM).

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di valutare l'espressione di 4 tra le principali APP quali: siero amiloide A (SAA), aptoglobina (Hp), LPS binding protein (LBP) e α 1-glicoproteina acida (AGP), nei prestomaci e nell'abomaso di bovini sani per studiare la possibile relazione presente tra le APP e la risposta immunitaria innata a livello dei prestomaci.

MATERIALI E METODI

Campionamento

Frammenti di parete dei prestomaci e dell'abomaso e mucose isolate, sono stati prelevati al macello da 4 animali senza apparenti alterazioni della mucosa dei prestomaci. Le porzioni di tessuto utilizzate per l'estrazione dell'RNA sono state conservate in RNAlater®, Sigma, e stoccate a -80°C; quelle utilizzate per l'estrazione delle proteine e per le analisi d'immunoistochimica sono state congelate immediatamente dopo il prelievo in azoto liquido e conservate a -80°C.

Analisi mediante PCR qualitativa e Real Time PCR

L'RNA totale è stato estratto utilizzando Trizol® Reagent, Invitrogen, secondo protocollo e quantificato con ND-1000 UV-vis spectrophotometer (NanoDrop Technologies Inc., USA). RNA corrispondente ad 1 μ g è stato retrotrascritto con iSCRIPT cDNA SYNTHESIS Kit, BioRad. Il cDNA ottenuto è stato utilizzato in PCR. La reazione è stata allestita in 10 μ l nelle seguenti condizioni: 1X buffer Vivantis, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM per ogni dNTP, 1 μ M per ogni primer and 0.025 unità di Taq Polimerasi. Gli stessi primer sono stati utilizzati in PCR Real Time ad eccezione di quelli dell'Hp e dell'AGP (Tab.1).

La Real Time PCR è stata allestita in 25 μ l di volume finale utilizzando SYBR Green mix, BioRad, e primer concentrati 450nM. I risultati ottenuti sono stati comparati mediante il calcolo del $\Delta\Delta$ Ct, utilizzando come gene housekeeping la β -actina e come organo di riferimento il fegato.

Western blot

Per l'estrazione delle proteine circa 50-100mg di tessuto sono stati omogenati meccanicamente in lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 4% NP40, 2% TritonX100, 1% Zwitterion 3.14, 5mM EDTA); in seguito a centrifugazione a 14000g per 10min è stato prelevato il surnatante contenente le proteine. 5 μ l di lisato e 1 μ l di siero bovino sono stati caricati su SDS-PAGE al 12% e terminata la corsa è stato effettuato il blotting su membrana di nitrocellulosa. La membrana è stata bloccata con una soluzione al 2% di latte in polvere in PBS. Gli anticorpi utilizzati sono riportati in tabella 2.

Immunofluorescenza per l'Aptoglobina

Sezioni criostatiche di rumine, reticolo, omaso ed abomaso sono state fissate in acetone e conservate a -80.

Le sezioni sono state incubate per 30 minuti a temperatura ambiente con 10% di siero di asino in tampone fosfato (PBS) addizionato di 0,3% di TritonX-100 e 3% di albumina sierica bovina (BSA), per bloccare il legame non specifico dell'anticorpo secondario.

Successivamente sono state incubate overnight a 4°C con l'anti-Hb (13,75 µg/ml; Life Diagnostic) in PBS con l'1% di BSA e il legame con l'antigene è stato rilevato grazie all'incubazione per 30 minuti con un anticorpo secondario coniugato col fluorocromo ALEXA 546. I nuclei sono stati quindi controcolorati con il 4',6-Diamidino-2-fenilindolo (DAPI).

I vetrini sono stati montati utilizzando un medium anti-fading (Vectashield; Vector) e conservati a 4°C fino all'analisi al microscopio ad epifluorescenza.

Come controllo negativo è stato omoesso l'anticorpo primario.

Per quanto riguarda l'immunoistochimica per la LBP si fa riferimento allo studio di Rhaman e colleghi (*Rahman MM. et al, 2010*).

RISULTATI

PCR qualitativa e Real Time PCR

Le PCR qualitative mostrano come la mucosa dei prestomaci e quella dell'abomaso esprimano le proteine di fase acuta investigate (Fig. 1). La quantificazione mediante Real Time PCR mostra che la SAA e la LBP sono notevolmente più espresse rispetto al fegato; in particolare le mucose di omaso e abomaso esprimono RNA relativo alla SAA 150-200 volte in più rispetto al fegato e circa 50 volte in più la mucosa del reticolo. La LBP è espressa circa 10-20 volte in più rispetto al fegato dei 3 prestomaci, ma è quasi assente nell'abomaso. Gli RNA relativi alla Hp e alla AGP sono quantificabili, ma la loro espressione risulta molto bassa rispetto al fegato (Fig. 2).

Western blot e Immunofluorescenza

I Western Blot effettuati rappresentano un'ulteriore conferma della presenza delle APP nei prestomaci. Come mostrato in figura 3, l'AGP è presente nelle mucose dei prestomaci e dell'abomaso con un peso molecolare di circa 40-42 KDa come è riscontrabile nel siero bovino. La LBP è presente in due isoforme del peso molecolare di 60 KDa e 20 KDa nelle mucose analizzate. I Western Blot relativi alla SAA e alla Hp sono in corso di studio.

La localizzazione dell'Hp mediante immunofluorescenza mostra come la proteina sia presente nel citoplasma delle cellule endoteliali di

tutti gli organi considerati e nell'epitelio ghiandolare dell'abomaso (Fig.4). L'immunofluorescenza relativa alle altre 3 proteine è in corso di analisi.

DISCUSSIONE

Il nostro studio, in primo luogo, ha dimostrato come sia presente a livello dei prestomaci e dell'abomaso un'attività di sintesi proteica; secondariamente che le principali proteine di fase acuta bovine vengono prodotte a livello locale in questa sede e non soltanto a livello epatico.

La dimostrazione che la mucosa dei prestomaci presenti un'attività di sintesi proteica è un concetto del tutto nuovo, in quanto fino ad oggi si pensava che i prestomaci dei ruminanti non presentassero un'attività secretoria propria.

La mucosa prestomacale è una superficie costantemente in contatto con agenti microbici, quindi è direttamente coinvolta nel controllo della risposta immunitaria locale e nel mantenimento dell'omeostasi dell'organismo ed è molto probabile che proprio per questo motivo ci sia una produzione di tali proteine in questa sede.

CONCLUSIONI

In conclusione, l'elevata espressione a livello della superficie mucosale dei prestomaci e dell'abomaso supporta l'ipotesi che le APP svolgano un ruolo di primaria importanza nella modulazione della risposta immunitaria innata locale e dell'omeostasi dell'organismo. La prospettiva futura di questo studio potrebbe essere rivolta all'allestimento di studi *in vivo* e *in vitro* che possano permetterci di capire in modo più esaustivo l'importanza e la precisa funzione delle APP a livello prestomacale.

BIBLIOGRAFIA

- Bingle CD, Craven CJ (2004) *Trends. Immunol.*; 25(2):53-55.
- Bottazzi B, Doni A, Garlanda C, Mantovani A (2010) *Annu. Rev. Immunol.*; 28:157-83
- Dommett R, Zilbauer M, George JT, Bajaj-Elliott M (2005) *Mol. Immunol.*; 42(8):903-12
- Gabay C, Kushner I (1999) *N. Engl.J. Med.*; 340(6): 448-454.
- Gruys E, Toussaint MJM, Niewold TA, Koopmans SJ (2005) *J. Zhejiang Univ. SCI*; 6B(11): 1045-1056.
- Hatanaka E, Furlaneto CJ, Ribeiro FP, Souza GM, Campa A (2004) *Immunol Lett.*; 91(1):33-37

Lecchi C, Avallone G, Giurovich M, Roccabianca P, Cecilian F (2008a) *Vet J.*; 180(2): 256-258
 Lecchi C, Cecilian F, Bernasconi S, Franciosi F, Bronzo V, Sartorelli P (2008b) *Vet. Res.*; 39(5):50
 Martínez Cordero E, González MM, Aguilar LD, Orozco EH, Hernández Pando R (2008) *Tuberculosis (Edinb.)*; 88(3):203-11
 Rahman MM, Lecchi C, Avallone G, Roccabianca P, Sartorelli P, Cecilian F (2010) *Vet. Immunol. Immunopathol.*, doi: 10.1016/j.vetimm.2010.04.006
 Sander LE, Sackett SD, Dierssen U, Beraza N, Linke RP, Müller M, Blander JM, Tacke F,

Trautwein C (2010) *J. Exp. Med.* 207(7):1453-1464
 Sandri S, Hatanaka E, Franco AG, Pedrosa AM, Monteiro HP, Campa A (2008) *Immunol Lett.*; 121(1):22-6.
 Uhlar CM, Whitehead AS (1999) *Eur J Biochem*; 265: 501–523
 Upragarin N, Landman WJ, Gaastra W, Gruys E (2005) *Histol. Histopathol.*; 20(4):1295-307
 Vreugdenhil AC, Dentener MA, Snoek AM, Greve JW, Buurman WA (1999) *J. Immunol. Methods*; 163: 2792–2798
 Zweigner J, Schumann RR, Weber JR (2006) *Microbes. Infect.*; 8(3):946-52

Nome	Frammento	Sequenza Primers senso	Sequenza Primers antisenso
SAA	121 bp	CCTGCTGGCCTGCCTGAC	GCTGCCTTCTGAGGACAGAG
LBP	130 bp	CCTGATTCTAGCATTTCGACAG	GGCTGAAGTTCAGGCACG
Hp	337 bp	GCAGCTTTCCTGGCAGG	CCAGACACATAACCCACACG
Hp_RT	67 bp	CCAAGATGGTCTCCAGCAT	GTGAGGAGCCATCGTTCAATTG
AGP	226 bp	GCATAGGCATCCAGGAATCA	GCACCGAAACAACTTTATTGATGC
AGP_RT	112 bp	GCATAGGCATCCAGGAATCA	TAGGACGCTTCTGTCTCC
β-actin	133 bp	CCAAAGCCAACCGTGAGA	CCAGAGTCCATGACAATGC

Tabella 1: sequenze dei primers utilizzati in PCR e Real Time PCR per le APP. I primers per SAA, LBP, Hp, AGP e β-actina sono stati disegnati a partire da sequenze disponibili in banca dati (numeri d'accesso: NM181016.3; NM001038674.1; NM_001040470.1, AM403243, BC142413.1). I primers per Real Time PCR utilizzati per l'Hp sono stati selezionati in letteratura (Eckersall et al., *J. Dairy Sci*; 2006).

Nome	Ab Primario	Tempo d'incubazione	Citazione
Mouse anti-human LBP (biG42)	1:200 (5µg/ml)	Over night	Rahman et al., <i>Vet. Imm.</i> 2010
Rabbit anti bovine Hp	1:5000 (0,55µg/ml)	45min	
Rabbit anti bovine AGP	1:2000 (1,65µg/ml)	45 min	Cecilian et al., <i>Vet. Imm.</i> 2007
Mouse anti β-actin	1:5000 (0,02µg/ml)	45 min	Corteggio et al., <i>J. Comp. Path.</i> 2010

Tabella 2: anticorpi utilizzati nei Western Blot per le APP.

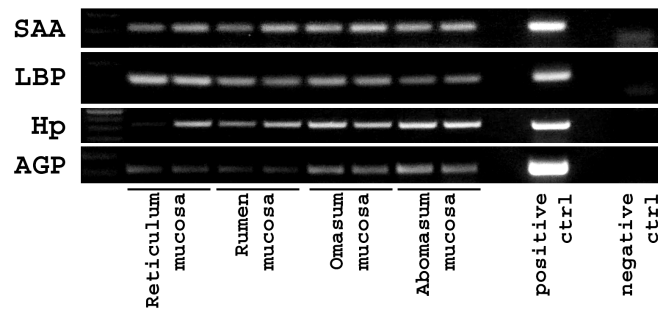


Figura 1: reazioni di PCR qualitativa per SAA, LBP, Hp e AGP: frammenti di 121bp, 130bp, 337bp e 226bp rispettivamente sono stati amplificati utilizzando primers specifici. Il fegato è stato utilizzato come controllo positivo.

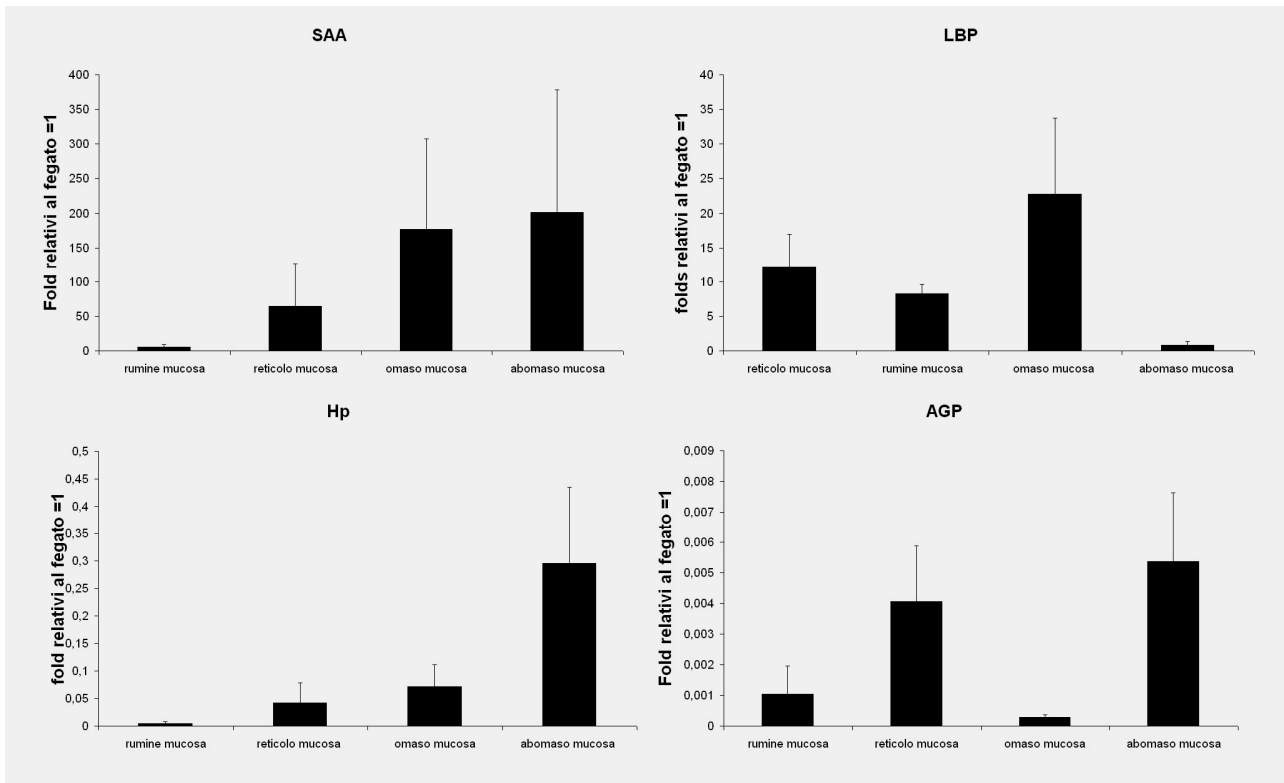


Figura 2: espressione relativa delle APP nella mucosa dei prestomaci e abomaso bovini. I valori sono rapportati al fegato, la cui espressione è stata posta pari ad 1. I risultati sono normalizzati sul fegato utilizzando come housekeeping il gene per la β -actina. I dati sono la media di 4 animali \pm Est.

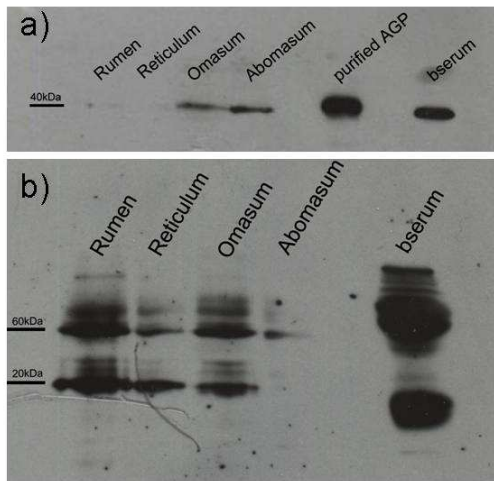


Figura 3: SDS-PAGE e WB delle APP nei prestomaci e nell'abomaso dopo immunocolorazione utilizzando anticorpi specifici e sviluppo in ECL. (a) SDS-PAGE e WB per l'AGP. Come controllo di peso molecolare è stata usata AGP purificata da plasma (Ceciliani et al., 2005) e siero bovino come controllo positivo. (b) SDS-PAGE e WB per la LBP. Siero bovino come controllo positivo.

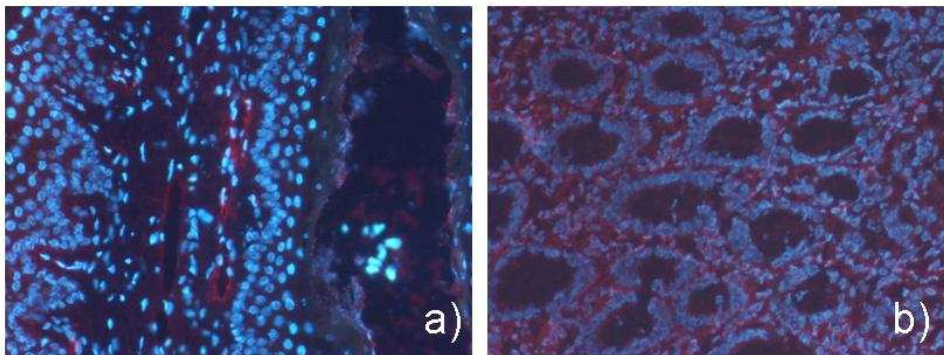


Figura 4: Immunofluorescenza su sezioni di tessuto per Hp. Il DAPI (blu) colora i nuclei delle cellule, l'ALEXA 546 (rosso) evidenzia la localizzazione dell'Hb. (a) localizzazione della proteina nel citoplasma delle cellule dell'endotelio ruminale (ingrandimento 200X); (b) presenza della proteina nel citoplasma dell'epitelio ghiandolare dell'abomaso (ingrandimento 200X).

ACUTE PHASE PROTEIN EXPRESSION IN NON-PATHOLOGIC BOVINE FORESTOMACH MUCOSAE

Serum amyloid A (SAA), haptoglobin (Hp), α_1 -acid glycoprotein (AGP) and LPS-binding protein (LBP) are acute phase proteins (APPs) involved in the systemic response to inflammation. They are mainly synthesized by liver but also by other tissues.

The aim of this study was to investigate whether the most common APP in bovine, including SAA, Hp, LBP and AGP, can be produced by bovine forestomach mucosae as preliminary step to understanding their potential role in the local immunity.

The expression of APPs was investigated by pairing gene expression rate and immunohistochemistry. Qualitative PCR showed that APPs can be observed in forestomach mucosae and Real-Time PCR showed very low amount of APPs in forestomach mucosae when compared with liver, the higher expression rate being that of SAA and Hp in abomasum, LBP in reticulum and AGP in rumen. The effective expression of APPs was investigated by immunohistochemistry and showed the presence of Hp protein in all the bovine forestomachs in endothelial cells and in the glandular epithelium of abomasum. LBP can be detected throughout the forestomach mucosae.

The finding that these APPs are actively synthesized in forestomach mucosae is remarkable and it should be viewed against the background that APPs play important roles as immunomodulatory molecules in gastrointestinal tract. Our results support the hypothesis that some of these APPs might also contribute to maintain the local homeostasis by reducing tissue damages, as well as increasing the specific bacterial resistance.

Key words: acute phase proteins, forestomach, bovine.

ESPRESSIONE DI miRNA IN MONOCITI BOVINI DOPO STIMOLAZIONE *IN VITRO* CON CHALLENGERS INFIAMMATORI

Dilda Francesca^a, Gioia Gloria^a, Pisani Laura Francesca^a, Restelli Laura^a, Albonico Francesca^a, Bronzo Valerio^a, Mortarino Michele^a, Sartorelli Paola^{ab}, Cecilianì Fabrizio^{ab}

^a *Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, via Celoria 10, 20133 Milano, Italy.* ^b *CISMA Centro Interdipartimentale di Studi sulla Ghiandola Mammaria, Università degli Studi di Milano, via Celoria 10, 20133 Milano, Italia*

I microRNA (miRNA) sono piccoli RNA non codificanti, che regolano l'espressione genica post-trascrizionale tramite interazione sequenza specifica con l'estremità 3'-UTR dell'mRNA bersaglio inibendo e/o bloccando la traduzione. Un singolo miRNA può regolare molti mRNA, e diversi miRNA possono regolare un solo bersaglio. Lo scopo di questo lavoro è quello di individuare alcuni miRNA espressi in monociti bovini CD14⁺ purificati da sangue intero attraverso l'utilizzo della tecnologia MACS (Miltenyi), in condizioni fisiologiche e dopo stimolazione con LPS (Gram -) e SEB (Gram+). Basandosi su precedenti studi in medicina umana, sono stati selezionati i miR-16 come controllo e i miR-125b, miR-155 (coinvolto nella risposta infiammatoria) miR-146a (regolatore negativo dell'immunità) e miR-223 come target. L'RNA totale è stato estratto mediante kit *mirVana*TM (Ambion), retrotrascritto con primer stem-loop specifici per ciascun miRNA e amplificato mediante PCR Real-Time con i corrispondenti MicroRNA TaqMan® Assay kit. I primer e le sonde TaqMan utilizzate, disegnate per l'uomo, sono state validate per il bovino. Ciascun target è stato quantificato mediante calcolo del $\Delta\Delta C_t$ verso il gene di controllo endogeno miR-16. I risultati ottenuti hanno confermato la presenza dei miRNA considerati nei monociti CD14⁺ e che tali miRNA sono differenzialmente espressi tra monociti controllo e stimolati. In particolare, miR-155 è sovraespresso in seguito a stimolazione con LPS, mentre con SEB i risultati hanno rivelato una down-regolazione del miR-125b e del miR-155.

Parole chiave: miRNA, monociti CD14⁺, bovino.

INTRODUZIONE

I microRNA (miRNA) sono una classe di piccoli RNA endogeni non codificanti, che partecipano attivamente nel meccanismo dell'RNA interferente. Sono trascritti a livello genomico sottoforma di lunghe molecole e, una volta processati, originano piccoli trascritti che causano un'inibizione della traduzione del messaggero piuttosto che la sua degradazione, oppure, in altri casi, possono avere un effetto contrario, cioè di attivazione della traduzione (Lee RC et al., 1993, Reinhart BJ et al., 2002, Vasudevan S et al., 2007). Generalmente vengono trascritti da regioni del genoma distinte da quelle che codificano per le proteine, oppure possono trovarsi in introni di sequenze codificanti, o in trascritti antisenso (esoni o introni) di sequenze codificanti. Rappresentano una classe di riboregolatori d'espressione; è stato stimato che nell'uomo intervengano nella regolazione del 30% del genoma. Si è osservato che i miRNA influenzano l'espressione genica, sia in termini temporali che spaziali, nei mammiferi così come negli organismi inferiori. Queste molecole derivano dal processamento di lunghi trascritti endogeni, provenienti da geni con inverted-repeats, poco strutturati ma con una sezione organizzata a forcina che viene excisa per dare il pre-miRNA da circa 70 bp. Negli animali questa forma ad "hairpin" esce dal nucleo ed arriva nel citoplasma, dove è attaccato da Dicer, che lo taglia così da ottenere catene di 20-23 bp che rimangono appaiate e presentano un'estremità 5' fosfato e un'estremità 3' con 2 nucleotidi protruding. Una sola di queste 2 catene appaiate sarà quella funzionante, l'altra verrà degradata. I miRNA "maturi" vengono integrati nel complesso RISC nel cui ambito vanno a bersagliare i target. I miRNA trovano zone complementari sull'mRNA, e solitamente interagiscono con la porzione 3' non tradotta, ma possono agire anche sulle regioni codificanti o sul 5' non tradotto; in questo modo si assiste al blocco della traduzione del messaggero, ma non alla sua degradazione.

Molti organismi, quando sono esposti a materiale genetico estraneo, per prevenire l'integrazione di tali acidi nucleici nel loro genoma, o per evitare il sovvertimento di processi cellulari importanti, mettono in atto meccanismi specifici di silenziamento (Mello CC et al., 2004).

Probabilmente ciascun miRNA può legare un centinaio di mRNA target, così come un unico mRNA può essere regolato da diversi miRNA; di conseguenza la regolazione dell'espressione di un

singolo miRNA è sufficiente ad alterare diversi processi cellulari. Alcuni miRNA vengono considerati costitutivi in quanto vengono espressi in tutti i tipi cellulari; la maggior parte però vengono espressi in modo tessuto e tempo-specifico ad indicare che sono coinvolti nei processi di differenziamento e sviluppo cellulare (Bushati N et al., 2007) ed inoltre sembra che l'espressione di diversi miRNA venga alterata in cellule tumorali (Calin GA et al., 2002).

La risposta immunitaria di un organismo si distingue in 2 tipologie differenti: la risposta immunitaria specifica e la risposta immunitaria innata.

Quest'ultima fornisce una prima linea di difesa aspecifica ed è prevalentemente mediata da cellule mieloidi quali macrofagi, monociti, cellule dendritiche e neutrofili. Le interazioni tra cellule immunitarie e patogeni si basano su pathways di segnale in cui sono coinvolte molte famiglie di recettori tra le quali la più caratterizzata è quella dei recettori TIR costituita da recettori Toll-like e recettori per l'interleuchina IL-1.

Nonostante la risposta immunitaria venga controllata prevalentemente a livello trascrizionale, sembra che anche i miRNA, coinvolti nella regolazione post-trascrizionale, ricoprano un ruolo importante.

Si suppone che la maggior parte dei miRNA, selettivamente espressi nelle cellule immunitarie, abbiano un'azione permissiva su maturazione, proliferazione e differenziamento delle cellule linfoidi e mieloidi. Alcuni miRNA, come miR-9, miR-146a e miR-155, invece, sembrano regolare negativamente la risposta di fase acuta conseguente all'attivazione del sistema immunitario, mediante l'inibizione delle proteine coinvolte nelle vie metaboliche che segnalano la presenza del patogeno (Tsitsiou E and Lindsay MA, 2009).

Gli studi sui miRNA finora eseguiti hanno interessato minimamente le specie di interesse zootecnico.

Sulla base di queste considerazioni abbiamo deciso di effettuare uno studio, *in vitro*, il cui scopo fosse quello di valutare la presenza e l'eventuale modulazione dell'espressione di alcuni miRNA in monociti bovini CD14⁺, in condizioni fisiologiche e patologiche.

Nei nostri studi sono stati considerati 5 differenti miRNA: miR-16, utilizzato come gene normalizzatore, miR-125b, miR-155, miR-146a e miR-223, coinvolti nella modulazione della risposta immunitaria innata e di cui volevamo valutare la possibile variazione d'espressione.

MATERIALI E METODI

Gli esperimenti sono stati condotti partendo da sangue intero di 5 bovine sane.

Il sangue è stato centrifugato a temperatura ambiente per 30min a 1260g, così da ottenere il buffy coat. Le cellule mononucleate sono state diluite 1:5 in PBS con EDTA 2mM; 10 ml di questa soluzione sono stati stratificati su 3 ml di Ficoll 1077 e centrifugati a 1500g, per 30min a 4°C. I mononucleati sono stati risospesi in 50 ml di PBS con EDTA 2mM e centrifugati a 400g, per 7min, a 4°C per rimuovere le piastrine. Le cellule sono state, poi, incubate per 15min a 4°C con l'anticorpo monoclonale anti-human CD14⁺ (Miltenyi Biotec) coniugato con nanoparticelle ferrose magnetizzate. La selezione dei monociti CD14⁺ è stata effettuata mediante colonne magnetiche (MACS[®] separation column–Miltenyi Biotec).

Sono state piastrate 2 x 10⁷ cellule per pozzetto in 300 µl di terreno di coltura ed incubate a 37°C, 5% CO₂ per 1h e 30min. Successivamente le cellule sono state incubate in medium di coltura normale e condizionato con LPS e SEB (Sigma Aldrich) per 14h a 37°C, 5% CO₂.

L'estrazione dei miRNA è stata effettuata utilizzando il *mirVana*[™] miRNA Isolation Kit (Ambion) mediante un'estrazione organica dell'RNA (Chomczynski e Sacchi, 1987), seguita da una purificazione su fase solida. In seguito si è proceduto con la retrotrascrizione utilizzando il TaqMan microRNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystem). Sul prodotto di questa reazione è stata effettuata la PCR Real Time, eseguita secondo il protocollo TaqMan MicroRNA Assay della ABI.

RISULTATI

Per ogni miRNA target è stata operata una quantificazione relativa mediante calcolo del $\Delta\Delta C_t$ nei confronti del campione di riferimento endogeno, operando una normalizzazione verso miR-16, gene housekeeping. Le quantità relative dei 4 target nei campioni attivati mediante LPS o SEB sono state confrontate con le quantità relative degli stessi miRNA nei campioni controllo_{T14}. Successivamente è stata effettuata un'analisi statistica mediante test Post HOC.

Per quanto riguarda il miR-155, è evidente un aumento d'espressione statisticamente significativo, nei monociti stimolati con LPS rispetto ai monociti controllo e una sua diminuzione nelle cellule stimolate con SEB.

Il secondo grafico illustra come il miR-125b venga down-regolato nei monociti stimolati con SEB, rispetto a quelli controllo.

miR-146a non evidenzia differenze statisticamente significative per quanto riguarda l'espressione nei monociti attivati con LPS o SEB rispetto al controllo.

Nell'ultimo grafico si nota come il profilo del miR-223 ricalchi quello del miR-146a, infatti non presenta differenze d'espressione statisticamente significative tra monociti stimolati con SEB o LPS e cellule controllo (Fig.1).

DISCUSSIONE

In questo lavoro si evidenzia in primo luogo l'effettiva presenza dei miRNA studiati nei monociti bovini e come alcuni di essi varino la loro espressione a seguito di stimolazione con LPS o SEB.

In particolare, nei monociti stimolati con gli LPS è evidente una sovra-espressione del miR-155, mentre dopo stimolazione con SEB il miR-155 viene down-regolato, così come il miR-125b.

Al contrario i miR-223 e miR-146a non subiscono significative variazioni dell'espressione nei monociti attivati rispetto a quelli controllo.

Il miR-155 agisce inibendo la produzione di TAB-2, uno dei fattori coinvolti nella cascata di TLR-2 e TLR-4; quindi la sua over-espressione in seguito a stimolazione con LPS può essere determinata dalla capacità della cellula di controllare la produzione di citochine pro-infiammatorie, stimolata dall'attivazione del TLR-4.

Per contro, il miR-125b agisce inibendo la produzione di TNF α , quindi la sua down-regolazione in seguito a stimolazione con SEB, può dipendere dalla necessità della cellula di attivare il processo infiammatorio per difendersi dall'infezione, e per farlo deve stimolare la cascata del segnale del TLR-2.

CONCLUSIONI

La prospettiva futura di questo esperimento potrebbe essere volta all'individuazione di una serie di miRNA bovini la cui espressione vari in presenza di una patologia, al fine di utilizzarli come marcatori per diagnosi rapide ed efficienti.

BIBLIOGRAFIA

Bushati N, Cohen SM(2007) *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*; **23**:175-205

Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M(2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; **99**:15524-29
 Chomczynski P, Sacchi N(1987) *Anal Biochem*; **162**(1):156-9
 Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V(1993) *Cell*; **75**:843-854

Mello CC, Conte DJ(2004) *Nature*; **431**:338-342
 Reinhart BJ, Bartel DP(2002) *Science*; **297**:1831
 Tsitsiou E, Lindsay MA(2009) *Curr Opin Pharmacol*; **9**(4):514-20
 Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA(2007) *Science*; **318** (5858):1931-34

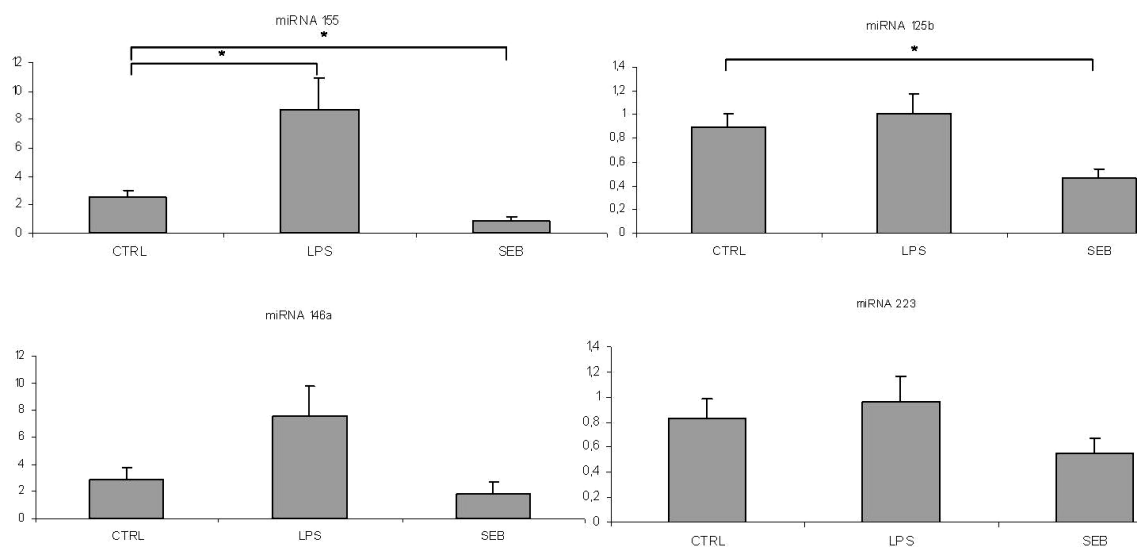


Fig. 1 Grafici ottenuti dopo quantificazione effettuata mediante PCR Real-Time. * differenze statisticamente significative ($p < 0,05$).

MIRNA EXPRESSION IN BOVINE MONOCYTES AFTER *IN VITRO* STIMULATION WITH INFLAMMATORY CHALLENGERS

MicroRNAs (miRNAs) are post-transcriptional regulators that bind to complementary sequences in the 3'-UTR region of target mRNAs. miRNAs expression is highly regulated in a time-dependent and tissue-specific fashion across species. Their regulation is scarcely understood but is of a special interest in the context of innate immunity and inflammation. Each miRNA can control hundreds of gene targets, and recent studies have suggested that they play important roles in cellular growth and differentiation and also contribute to the regulation of inflammation. In as such, miRNA's expression might be altered during innate immune reactions against pathogens. The aim of this study is to individuate are modulated in bovine CD14⁺ monocytes in physiological conditions and after LPS or SEB stimulation. Blood from healthy cows were used for CD14⁺ isolation using magnetic activated cell sorting (Macs technology, Miltenyi). Five miRNAs were selected: miR-16 as control, miR-155 (component of inflammatory response), miR-146a (negative regulator of inflammation) miR-125b and miR-223 as targets. Total RNA was extracted with the kit *mirvana*TM (Ambion), reverse transcribed with primers specific stem-loop for each miRNA and amplified by Real-Time PCR with corresponding Human TaqMan[®] MicroRNA Assays kit. Relative expression of each miRNA was calculated using the comparative $\Delta\Delta C_t$ method using miR-16 as control gene. Successful amplification was achieved for all the studied miRNAs confirming their expression in bovine CD14⁺ monocytes. In particular, miR-155 was up-regulated after LPS stimulation, whereas SEB stimulation effect was an appreciable down-regulation of miR-125b and miR-155.

Key words: miRNA, CD14⁺ monocytes, bovine.

DIFFERENZIAMENTO NEUROENDOCRINO NEI TUMORI UROTELIALI ASSOCIATI A PAPPILLOMAVIRUS IN BOVINI ALIMENTATI CON FELCE

Urraro Chiara¹, Lucà Roberta¹, Borzacchiello Giuseppe¹, Perillo Antonella², Leonardi Leonardo³, Ferrari Angelo⁴, Russo Valeria¹, Roperto Sante¹

¹ Dipartimento di Patologia e Sanità Animale, Università di Napoli Federico II. ² Dipartimento di Sanità e Benessere Animale, Università di Bari. ³ Dipartimento di Scienze Biopatologiche ed Igiene delle produzioni animali e alimentari, Università di Perugia. ⁴ Centro Nazionale di Referenza per l'oncologia veterinaria e comparata (CEROVEC)

I tumori della vescica del bovino sono particolarmente rari rappresentando l'0.05% di tutte le neoplasie maligne che si verificano in questa specie. I tumori della vescica sono, invece, molto comuni in bovini adulti, di età compresa tra 4-8 anni, allevati allo stato brado e/o semibrado potendo raggiungere fino al 90%. Nel determinismo dei tumori uroteliali del bovino un ruolo centrale viene svolto dalla felce (*Pteridium aquilinum*) e dal papillomavirus bovino tipo 2. Gli istotipi più frequenti di tumori vescicali sono quelli ad istogenesi uroteliale. Come nell'uomo anche in medicina veterinaria le cellule uroteliali neoplastiche si caratterizzano per le potenzialità di differenziazione alla base di moltissime varianti uroteliali riportate in letteratura. In particolare, una via di differenziazione è quella neuroendocrina. In Medicina Umana i tumori neuroendocrini della vescica sono estremamente rari presentando un'incidenza compresa tra lo 0,5% e 0,7%. Sono temuti perché molto aggressivi dando origine a fenomeni metastatici in alta percentuale. In Medicina Veterinaria non sono finora riportati aspetti di differenziazione neuroendocrina dei tumori vescicali di bovini. Con questa breve nota, si vuole riportare i dati preliminari immunoistochimici riscontrati in tumori uroteliali con aspetti di differenziazione neuroendocrina utilizzando come markers la cromogranina A, la serotonina e la sinaptofisina. Benché preliminari, questi dimostrano come le cellule uroteliali del bovino abbiano una grande potenzialità di differenziazione simile a quella già riportata in medicina umana.

Parole chiave: BPV-2, felce, differenziazione neuroendocrina.

NEUROENDOCRINE DIFFERENTIATION IN UROTHELIAL TUMOURS ASSOCIATED TO PAPPILLOMAVIRUS IN CATTLE FED WITH BRACKEN FERN

Bladder tumours in cattle are very rare, but they are common, until 90%, in 4 to 8 year old cattle grazing on wild or natural state. BPV-2 and bracken fern play a central role in bladder oncogenesis. Tumours with epithelial histogenesis are the most frequent bladder tumours. As in human, also in Veterinary Medicine, on the basis of many urothelial variants reported in literature, neoplastic urothelial cells show a potential differentiation; neuroendocrine differentiation is one of these. In human, neuroendocrine bladder cancer is rare but it has a high aggressiveness giving metastasis on high percentage. In veterinary medicine, neuroendocrine differentiation in cattle bladder tumours were not reported until now. We report preliminary immunoistochemistry findings detected in urothelial tumours with neuroendocrine differentiation, by using markers, such as chromogranin A, serotonin, synaptophysin and showing that the high potential differentiation of cattle urothelial tumours is very similar to the one reported in human.

Key words: BPV-2, bracken fern, neuroendocrine differentiation.

L'ONCOPROTEINA E7 DEL PAPPILLOMAVIRUS BOVINO SI LEGA FISICAMENTE A P600 IN SARCOIDI EQUINI

Corteggio Annunziata, Di Geronimo Ornella, Roperto Sante, Roperto Franco, Borzacchiello Giuseppe

Dipartimento di Patologia e Sanità animale – Facoltà di Medicina veterinaria – Università degli Studi di Napoli Federico II – Napoli

Il sarcoide equino è un tumore non metastatico della cute di origine fibroblastica, particolarmente frequente negli equidi. È universalmente riconosciuto che nell'eziopatogenesi del sarcoide è coinvolto il papillomavirus bovino tipo 1 o 2 (BPV-1/2). In letteratura esistono pochi studi riguardanti gli aspetti di patologia cellulare e molecolare del sarcoide. Più in particolare non si conoscono i meccanismi attraverso i quali gli oncogeni virali E5 ed E7 contribuiscono all'insorgere di questa neoplasia.

Lo scopo di questo studio è stato quello di indagare il ruolo dell'oncogene E7 del BPV in sarcoidi equini; in particolare è stato analizzato un meccanismo d'azione mediato dal legame dell'oncoproteina E7 con p600 (un fattore associato alla proteina del retinoblastoma) ed il ruolo funzionale di quest'interazione nell'inibizione dell'anoikisi.

Esperimenti di co-immunoprecipitazione dimostrano che l'oncoproteina E7 è in complesso molecolare con p600 e colocalizza nelle cellule tumorali. Inoltre, i dati molecolari e di immunostochimica evidenziano che p600 è espressa sia nella cute normale che nei tumori dove si registrano più elevati livelli di espressione della proteina. L'analisi dei segnali molecolari responsabili dell'anoikisi mostrano che la chinasi dell'adesione focale (FAK) è overespressa ed upregolata nei sarcoidi, mentre i profili di espressione delle MAP chinasi MEK ed ERK non presentano sostanziali differenze tra sarcoidi e cute normale.

In conclusione, per la prima volta è stata dimostrata in vivo l'interazione molecolare tra BPV-E7 e p600, e la sua attivazione funzionale. Tale interazione potrebbe giocare un ruolo importante nel determinismo del sarcoide equino che si conferma un valido modello animale per lo studio del meccanismo di cancerogenesi mediata dagli oncogeni del BPV.

Parole chiave: papillomavirus bovino; E7; p600; sarcoide.

BOVINE PAPPILLOMAVIRUS E7 ONCOPROTEIN BINDS TO P600 IN NATURALLY OCCURRING EQUINE SARCOIDS

The sarcoid is a non metastatic tumor arising from skin fibroblasts which is commonly encountered in equids. It is widely accepted that Bovine Papillomaviruses types 1 or 2 (BPV 1/2) are associated to sarcoids. Studies regarding the molecular and cellular aspects of sarcoid pathology are lacking. Particularly, molecular mechanisms by which E5 and E7 oncogenes to induce equine sarcoids are unknown so far.

The aim of the present study was to analyze the role of BPV E7 in naturally occurring equine sarcoids, particularly we ascertain the molecular mechanism by which BPV E7 interacts with p600 (600-kDa retinoblastoma protein-associated factor) and the functional role of this interaction in inducing the anoikis resistance.

Co-immunoprecipitation experiments show that the interaction between p600 and BPV E7 takes place in sarcoids where they co-localize. Besides, biochemical and immunohistochemical analysis show that p600 is expressed in both sarcoids and normal skin, although the amount of protein recorded in tumor samples is higher than normal skin. The molecular signals underlying anoikis are also expressed; particularly the focal adhesion kinase (FAK) is overexpressed and upregulated in tumor samples, whereas the MAP Kinases (MEK and ERK) expression is not upregulated in sarcoids when compared to normal samples. Our results demonstrate, for the first time, that E7 interacts with p600 during the natural history of BPV induced equine sarcoids and that this interaction may be responsible for p600 functional activation. The E7-p600 interaction may play an important role in sarcoid carcinogenesis. Finally, the "equine system" provides a suitable animal model to gain new insights into the molecular mechanisms underlying the BPV-induced carcinogenesis.

Key words: Bovine Papillomavirus, E7, P600, sarcoid.

LA PARATUBERCOLOSI: ASPETTI PATOGENETICI, ZONOSICI E DIAGNOSTICI

Rocca Stefano, Cubeddu Tiziana, Farigu Serafina, Leoni Antonio

Dipartimento di Patologia e Clinica Veterinaria, Sezione di Patologia Generale e Anatomia Patologica, Facoltà di Medicina Veterinaria. Università degli Studi di Sassari, Via Vienna, 2 - 07100 Sassari, Italia

Una delle patologie di maggior interesse veterinario è la malattia di Johne dei ruminanti, sostenuta dal *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map). L'interesse destato da tale patologia è motivato essenzialmente dalla mancata o insufficiente risposta a tre quesiti: la patogenesi non è del tutto chiara, la diagnosi appare difficoltosa in alcuni momenti e/o forme della malattia, la possibilità di inserire l'uomo tra gli ospiti recettivi e sensibili al micobatterio. Il nostro gruppo di ricerca, in collaborazione con illustri scuole di patologi nazionali, è coinvolto oramai da diversi anni nello studio di tale malattia nel tentativo di far luce e dare delle risposte ai tre quesiti precedentemente citati. Appare chiaro che la patologia nei nostri animali può presentarsi in forme atipiche difficilmente diagnosticabili con le tecniche tradizionali, per cui l'ausilio di metodiche biomolecolari ad elevata sensibilità si rendono necessarie per aumentare le chance di una corretta diagnosi. La diagnosi biomolecolare è mirata all'individuazione di diverse sequenze target specifiche per Map come F57 e ISMav2, che si affiancano all'IS900, descritta anche in altri micobatteri non patogeni e quindi ritenuta non specifica. Tutto ciò è indispensabile in virtù del fatto che esistono evidenze scientifiche sempre più numerose attestanti che Map può inserirsi nella catena alimentare dell'uomo a diversi livelli, e che potrebbe, inoltre, giocare un ruolo di primo piano in importanti patologie dell'uomo quali ad esempio il morbo di Crohn. Il latte potrebbe costituire uno delle possibili punti di contatto tra uomo e animali infetti. Alcuni autori hanno evidenziato il reale pericolo di una inefficace inattivazione di Map con alcuni dei comuni metodi di trattamento termico utilizzati per il latte soprattutto in presenza di alte dosi di micobatteri eliminati. In questa lettura verranno illustrati i recenti sviluppi scientifici riguardanti la malattia di Johne in ambito internazionale e in particolare i riscontri ottenuti nelle ricerche eseguite presso il nostro Dipartimento.

Parole chiave: malattia di Crohn, paratubercolosi, *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*, PCR in fase liquida, RT-PCR in situ.

THE JOHNE'S DISEASE: PATHOGENESIS, ZONOSIC AND DIAGNOSTIC ASPECTS

Paratuberculosis of ruminants (Johne's disease or JD) was reported by Johne and Frothingham, who described a chronic enteritis involving the terminal portion of the ruminant small intestine. The agent of paratuberculosis was universally recognized as a mycobacterium, and after numerous changes in classification was definitively identified as a subspecies and given the name Map. Despite years of research that tried to conclusively demonstrate an association between Map and CD, the hypothesis remained controversial. In particular, one of the principal objections raised was the lack of positive staining for acid-fast bacilli (AFB) in sections of tissue affected with CD. In recent studies identified IS900-like sequences derived from other non-pathogenic organisms present in the intestines of man and animals. Two additional Map-specific markers have been established: the gene locus F57 and the ISMav2 insertion sequence. However, to establish if Map is the real agent of the disease it is necessary to detect transcriptase through techniques that reveal RNA.

Key words: Crohn's Disease, Johne's Disease, *Mycobacterium avium* ssp. *Paratuberculosis*, liquid phase RT-PCR, in situ RT-PCR.

STUDIO FOLLOW-UP SULL'INFEZIONE DA *Mycobacterium avium* sp. *paratuberculosis* IN UN GREGGE OVINO: RISULTATI SIEROLOGICI E ISTOPATOLOGICI

Maestrale Caterina¹, Sechi Stefania², Ponti Nicoletta¹, Demontis Francesca¹, Denti Stefano¹, Piazza Giuseppe¹, Pedditzi Aureliana¹, Macciocu Simona¹, Lollai Stefano¹, Casu Sara², Carta Antonello², Ligios Ciriaco^{1*}

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, "G. Pegreffi" – Sassari. ² Settore Genetica e Biotecnologie, DIRPA, AGRIS Sardegna, Olmedo (SS)

Al fine di individuare Quantitative Trait Locus (QTL) che influenzano l'infezione da *Mycobacterium avium* sp. *paratuberculosis* (MAP), un gregge endemicamente infetto da Paratubercolosi (PTB) è stato sottoposto ad un lungo follow-up genetico, clinico, sierologico, batteriologico ed istopatologico. La popolazione sperimentale era costituita ogni anno da circa 900 pecore di 4 classi di età. In questo gregge non si procedeva ad alcuna riforma volontaria fino al termine della quarta lattazione, quando tutti gli animali di questa coorte di età (n= 200) venivano macellati e sottoposti ad esami anatomo-istopatologici. Inoltre su tutto il gregge, nel corso del periodo di studio, sono stati effettuati ogni 6 mesi esami sierologici (ELISA) per PTB e su tutti gli animali che mostravano segni clinici indicativi della malattia, esami anatomo-istopatologici e batteriologici.

In questo lavoro sono illustrati i risultati preliminari degli esami sierologici ed istopatologici effettuati nel corso dei primi 6 anni di follow-up.

La prevalenza sierologica di PTB variava dal 10% al 20%, mentre la prevalenza subclinica, rilevata con l'esame istologico sugli animali abbattuti all'età dei 4 anni, era mediamente del 9.7%. L'incidenza clinica annuale su tutto il gregge variava dal 1.2 % al 2.6%. Mediante regressione logistica si è dimostrato che le figlie delle pecore sieropositive avevano un rischio 10 volte superiore di diventare a loro volta sieropositive (p-value <0.01, CI 99% 4.9 – 20.4) rispetto alle figlie delle pecore sieronegative. Inoltre questi risultati preliminari hanno evidenziato una diversa incidenza della malattia nelle figlie all'interno delle 37 diverse famiglie. Ulteriori analisi sono tuttora in corso per identificare le componenti genetiche influenzanti il decorso della PTB.

Parole chiave: paratubercolosi, ovino, istopatologia, sierologia.

FOLLOW-UP STUDY ON *Mycobacterium avium* sp. *paratuberculosis* INFECTION IN A SHEEP FLOCK: SEROLOGICAL AND HISTOPATHOLOGICAL FINDINGS

To verify the presence of Quantitative Trait Locus (QTL) modulating the occurrence of Paratuberculosis (PTB), we have carried out a six-year genetic, sierological, histological and bacteriological follow-up on an endemically PTB-infected sheep flock. The experimental flock consisted of 900 ewes of 4 age classes. There was no voluntary culling in the flock and each cohort of ewes was slaughtered at the end of 4th lactation. This flock was bled every 6 months and the serum samples were examined by ELISA for PTB. Yearly, all the sheep belonging to the four-year age cohort were slaughtered and submitted to appropriate anatomo-histopathological examinations. Moreover, sheep with clinical signs indicative of PTB were sacrificed and examined by histopathological and bacteriological means throughout the follow-up period.

Here we describe the preliminary sierological and histopatological results obtained over a six-year follow-up period. Within the flock the sierological prevalence ranged from 10% to 20 %, while the sub-clinical prevalence (estimated by histopatological examination) was on average 9.7%. The clinical incidence ranged from 1.2% to 2.6%. Logistic regression demonstrated that the offspring from sieropositive ewes had a 10-fold (p-value <0.01, CI 99% 4.9 – 20.4) higher risk to become sieropositive than the offspring derived from the sieronegative ewes. Our preliminary results showed a different incidence of PTB among the daughters within the different families. Further analyses are still ongoing to investigate the genetic factors of the host that may influence the epidemiological course of PTB.

Key words: paratuberculosis, sheep, histopathology, serology.

ALTERAZIONI, ACCUMULO DI METALLI PESANTI E PRESENZA DI ADDOTTI AL DNA IN PARENCHIMI DI OVINI DELL'AREA DI PORTOSCUSO (SULCIS - IGLESIENTE – SARDEGNA). UN NECESSARIO CONFRONTO CON I DATI DEL 1992

Farigu Serafina¹, Rocca Stefano¹, Carta Gianfranco², Biggeri Annibale³, Catelan Dolores³, Peluso Marco⁴, Leoni Antonio¹

¹ Dipartimento di Patologia e Clinica Veterinaria – Università degli Studi di Sassari. ² Associazione Regionale Allevatori, Cagliari. ³ Dipartimento di Statistica “G. Parenti” – Università degli Studi di Firenze. ⁴ Unità di Citologia Analitica e Biomolecolare – Istituto per lo Studio e la Prevenzione Oncologica, Firenze

Allo scopo di valutare le conseguenze dell'esposizione ad alti livelli di inquinanti ambientali (Pb, Cd, Zn) sono state eseguite indagini anatomo-istopatologiche, tossicologiche e di ricerca degli addotti a DNA (MDA) su polmone, fegato e reni di 14 ovini allevati a distanza varia dal polo industriale di Portoscuso e su tre ovini di controllo provenienti da zone sicuramente non inquinate. Gli accertamenti tossicologici sono stati effettuati mediante analisi in ICP/MS su strumento Perkin-Elmer DRC II utilizzando i segnali dovuti agli ioni specifici dei vari elementi. La determinazione degli addotti è stata eseguita mediante tecniche cromatografiche e sonde marcate con radioisotopi.

All'esame anatomo-patologico veniva frequentemente documentato lo stato cachettico degli animali. Fegato e reni presentavano in genere moderate variazioni di dimensioni e colore tendente al rosso-grigiastro. Il polmone mostrava frequenti quadri di bronchite e broncopolmonite catarrale e catarral-purulenta. L'esame istopatologico evidenziava nel fegato un costante e diffuso rigonfiamento torbido e, in 8 degli organi esaminati, flogosi non proliferative sia diffuse che a focolai. A livello renale si apprezzava un grave e diffuso rigonfiamento torbido nell'epitelio tubulare e quadri di glomerulonefriti a vario stadio evolutivo. Nel polmone venivano evidenziati frequenti polmoniti granulomatoze di origine parassitaria e polmoniti interstiziali croniche di presumibile origine virale (MVV).

L'elaborazione statistica dei risultati evidenziava una differenza statisticamente significativa ($P < 0.05$) tra casi e controlli relativamente all'accumulo di metalli nei 3 organi considerati ad eccezione dello Zn nel fegato e nel rene. In particolar modo, esisteva una forte correlazione tra l'accumulo del singolo metallo nei diversi organi, tra addotti in rene e fegato e tra Cd e MDA in fegato, rene e polmone. Altamente significativa ($P < 0.05$) era la correlazione fra Cd in fegato e rene e distanza dal sito inquinante, così come tra accumulo del Cd nei 3 organi considerati e i valori di isoconcentrazione nel terreno ($P < 0.05$). In merito alle correlazioni fra lesioni e livelli di accumulo dei metalli pesanti, si osserva un effetto del Pb sulle epatiti e del Cd sulle degenerazioni a livello renale.

Nel complesso, l'importante accumulo di metalli pesanti (Pb e Cd) e di addotti a DNA, decisamente superiore rispetto a quello degli ovini di controllo, giustifica ampiamente le lesioni a carattere degenerativo e/o infiammatorio osservate negli ovini e conferma la persistenza di gravi problematiche sanitarie nella popolazione animale e umana nell'area industriale di Portoscuso.

Parole chiave: Metalli pesanti, lesioni, tossicologia, addotti al DNA (MDA).

LESIONS, HEAVY METALS ACCUMULATION AND DNA-ADDUCT PRESENCE IN SHEEP OF INDUSTRIAL SITE OF PORTOSCUSO (SULCIS-IGLESIENTE, SARDINIA). A NECESSARY COMPARISON WITH 1992' DATA

Anatomo-histopathological observations, toxicological determinations and reasearch of DNA-adducts (MDA) was performed in lung, liver and kidney of 14 sheep breed near industrial site of Portoscuso (Sardinia) and in 3 control sheep. Macro and microscopical observations revealed marked inflammatory lesions in lungs, and diffuse degenerative alterations in liver and kidney of all sheep breed near industrial site. The toxicological determinations confirm a high level of presence of Pb, Cd and Zn in all organs, particularly in liver and kidney. Finally, in comparison with ovine controls, a significative presence of MDA was demonstrated in sheep of polluted area.

Key words: heavy metals, lesions, toxicology, DNA-adduct (MDA).

ESPRESSIONE IMMUNOISTOCHEMICA DELLA METALLOTIONEINA (MT-1) NELLE NEOPLASIE DELLE GHIANDOLE APOCRINE DELLA CUTI DEL CANE

Martano Manuela*, Restucci Brunella, De Vico Gionata***, Maiolino Paola****

** Dipartimento di Patologia e Sanità animale- sezione di Anatomia Patologica- Facoltà di Scienze Biotecnologiche; ** Dipartimento di Patologia e Sanità animale- sezione di Anatomia Patologica, - Facoltà di Medicina Veterinaria; *** Dipartimento delle Scienze Biologiche- Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali – Università degli Studi di Napoli Federico II.*

Le metallothioneine (MTs) rappresentano una classe di proteine intracellulari, a basso peso molecolare, ricche di cisteina, aventi un'elevata capacità di legare metalli pesanti. Esse sono coinvolte in numerosi processi fisiologici e patologici e giocano un ruolo importante nella carcinogenesi (Alves et al, 2006). Dal momento che scarsi sono gli studi in Medicina Veterinaria (Dincer et al, 2001), abbiamo ritenuto opportuno valutare l'espressione della MT-1 nelle neoplasie delle ghiandole apocrine del cane. Campioni di ghiandole apocrine normali e neoplastiche, benigne e maligne, sono stati fissati in formalina, inclusi in paraffina, e sottoposti a metodica immunohistochemica con l'anticorpo monoclonale anti-MT1 (UC1-MT, abcam). I risultati ottenuti hanno evidenziato, nelle ghiandole apocrine normali e nelle neoplasie benigne, una positività, prevalentemente citoplasmatica, variabile da lieve e sporadica a forte e diffusa, a carico delle cellule epiteliali dei dotti. E' stato evidenziato, inoltre, un progressivo aumento del numero di cellule positive, procedendo dagli adenocarcinomi ben differenziati, a quelli moderatamente e scarsamente differenziati, dove l'espressione della MT era intensa e diffusa nella maggior parte delle cellule neoplastiche. Nell'ambito di alcuni nidi neoplastici negativi, inoltre, era possibile evidenziare singole cellule con forte positività sia nucleare che citoplasmatica, conferendo un aspetto cosiddetto a mosaico. I risultati ottenuti sembrano del tutto sovrapponibili a quelli riscontrati in oncologia umana, che riportano l'aumento dell'espressione della MT nelle neoplasie maligne rispetto a quelle benigne e in particolare nelle neoplasie poco differenziate rispetto a quelle ben differenziate (Ebert et al, 1995). In conclusione, i nostri risultati sembrano confermare l'importante ruolo svolto dalle MTs nella induzione e nella progressione neoplastica e indicano che ulteriori ed approfonditi studi sui meccanismi e sui fattori che regolano le funzioni biologiche delle MTs nelle neoplasie, sono necessari.

Parole chiave: metallothioneine, ghiandole apocrine, cane.

INTRODUZIONE

Le metallothioneine (MTs) rappresentano una classe di proteine intracellulari, a basso peso molecolare, che, per l'alto contenuto di cisteina, sono caratterizzate da un'elevata capacità di legare metalli pesanti, sia tossici, come Cd e Hg, che essenziali, come Zn e Cu. Sono proteine ubiquitarie, presenti nei microrganismi e negli organismi vegetali ed animali, nei quali sono particolarmente abbondanti nel fegato e nel rene. Nonostante sono proteine prevalentemente citoplasmatiche, possono essere evidenziate anche nei nuclei di cellule in attiva proliferazione (Cherian, 1994; Ogra e Suzuki, 2000). La famiglia delle MTs viene suddivisa in 4 classi: le MTI e MTII presenti in numerosi organi e tessuti; le MTIII e la MTIV localizzate rispettivamente nei neuroni cerebrali e nelle cellule dell'epitelio squamoso stratificato.

Le metallothioneine sono coinvolte in numerosi processi fisiologici e patologici e giocano un ruolo determinante nella detossificazione e nella omeostasi dei metalli, e, più in generale, nella regolazione dei processi causati dallo stress cellulare. Negli ultimi anni l'interesse generato dallo studio delle metallothioneine è aumentato soprattutto in quanto tali proteine sono considerate da alcuni Autori dei marcatori prognostici altamente significativi in numerosi tumori dell'uomo (Alves et al, 2006; Dziegiel et al, 2004; Tan et al, 1999). Dal momento che scarsi sono gli studi in oncologia veterinaria (Dincer et al, 2001), abbiamo ritenuto opportuno valutare l'espressione della MT-I e MTII nelle neoplasie delle ghiandole apocrine della cute del cane. Tali neoplasie rappresentano lo 0,7-2,2 % dei tumori cutanei del cane e presentano una predisposizione di razza (golden retrievers, collies, german shepherds, old english sheepdogs, cocker spaniels). Circa il 70% dei tumori delle ghiandole apocrine del cane sono benigni. I tumori maligni tendono ad essere localmente invasivi ed hanno un alto potenziale metastatico (Meuten, 2002).

MATERIALI E METODI

Per questo studio sono stati analizzati 20 campioni di neoplasie delle ghiandole apocrine cutanee, e 3 campioni di cute normale come controllo. Tali campioni, fissati in formalina al 10 %, sono stati routinariamente processati, classificati istologicamente secondo i criteri del WHO (Goldschmidt, 1998) (tabella 1) e graduati in tumori di Grado 1 (ben differenziati), tumori di Grado 2 (moderatamente differenziati) e tumori

di Grado 3 (scarsamente differenziati), prendendo in considerazione vari parametri quali il grado di formazione dei tubuli, le irregolarità di dimensioni, forma e colorazione dei nuclei ed il numero di mitosi (Misdorp, 1976).

I campioni sono stati quindi sottoposti a metodica immunostochimica (streptavidina-biotina-perossidasi) utilizzando un anticorpo monoclonale anti-MTI e MTII (UC1-MT, abcam). L'intensità dell'espressione della MTI e MTII è stata quantificata come segue:

- Singole cellule positive : + ;
- Foci di cellule con positività forte: ++ ;
- > 50% di cellule con positività forte o moderata : +++

RISULTATI

I risultati ottenuti hanno evidenziato, nelle ghiandole apocrine normali e nelle neoplasie benigne, una positività, prevalentemente citoplasmatica, variabile da lieve e sporadica a forte e diffusa, a carico delle cellule epiteliali dei dotti (figure 1 e 2). È stato evidenziato, inoltre, un progressivo aumento sia del numero di cellule positive (tab.2), che della intensità della colorazione immunostochimica, procedendo dagli adenocarcinomi ben differenziati (fig.3), a quelli moderatamente (fig.4) e scarsamente differenziati, dove l'espressione della MT era intensa e diffusa nella maggior parte delle cellule neoplastiche (fig.5). Nell'ambito di alcuni nidi neoplastici negativi, inoltre, era possibile evidenziare singole cellule con forte positività sia nucleare che citoplasmatica, che conferivano alla lesione un aspetto "a mosaico" (fig.4).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I risultati ottenuti sembrano del tutto sovrapponibili a quelli riscontrati in oncologia umana, che riportano l'aumento dell'espressione della MT nelle neoplasie maligne rispetto a quelle benigne ed in particolare nelle neoplasie poco differenziate rispetto a quelle ben differenziate (Ebert et al, 1995). Il significato di tale aumento potrebbe essere spiegato prendendo in considerazione l'effetto protettivo che ha la MT in caso di danno cellulare. Tale proteina infatti si può riscontrare in due forme: una forma libera (APO-MT) e una legata ai metalli (HOLO-MT). Quest'ultima aumenta in caso di stress persistenti e ha un effetto anti-carcinogenetico. Una riduzione della HOLO-MT è stata infatti associata ad aumento dei danni mutageni al DNA e quindi ad aumento della progressione neoplastica

(McGee et al, 2009). La forma libera della MT (APO-MT) invece aumenta in caso di danni mutageni e/o esposizione persistente ad un agente etiologico, ed è stato ipotizzato che abbia un ruolo determinante nella carcinogenesi (Dincer et al, 2001). Infatti la APO-MT interagendo con lo Zn della P53, ne causerebbe l'inattivazione, con conseguente perdita del controllo della proliferazione cellulare e induzione della progressione neoplastica (Dincer et al, 2001; Tan et al, 1999). Un aumento della APO-MT è associato quindi ad aumento della possibilità di progressione neoplastica.

Il riscontro, inoltre, di un aumento della espressione nucleare della MT nella neoplasie maligne, rispetto a quelle benigne, dove la MT era localizzata prevalentemente a livello citoplasmatico, potrebbe essere correlato - all'interazione della MT con alcuni ioni metallici che si trovano nel nucleo, e quindi anche con lo Zn della P53; - all'incremento della sintesi di MT durante l'accrescimento cellulare; - allo stadio di sviluppo: la MT negli epatociti del feto e del neonato è localizzata nel nucleo (Tan et al, 1999; Bremner, 1991).

In conclusione, i nostri risultati sembrano confermare l'importante ruolo svolto dalle MTs (APO-MT) nella induzione e nella progressione neoplastica e indicano che ulteriori ed approfonditi studi sui meccanismi e sui fattori che regolano le funzioni biologiche delle MTs nelle neoplasie, sono necessari.

BIBLIOGRAFIA

- Alves SM, Cardoso SV, Bernardes VdF, Machado VC, Alves Mesquita R, Vieira do Carmo MA and Ferreira Aguiar MC: Metallothionein immunostaining in adenoid cystic carcinomas of the salivary glands; *Oral Oncology*; Volume 43, Issue 3, March 2007, Pages 252-256;
- Bremner I: Nutritional and physiologic significance of metallothionein; *Methods Enzymol.* 1991;205:25-35.
- Cherian MG: The significance of the nuclear and cytoplasmic localization of metallothionein in human liver and tumor cells; *Environ Health Perspect.* 1994 Sep;102 Suppl 3:131-5.
- Dincer Z, Jasani B, Haywood S, Mullins JE and Fuentealba IC: Metallothionein Expression in Canine and Feline Mammary and Melanotic Tumours; *J Comp Pathol.* 2001 Aug-Oct;125(2-3):130-6.
- Dziegiel P, Jeleń M, Muszczyńska B, Maciejczyk A, Szulc A, Podhorska-Okołów M, Cegielski M, Zabel M: Role of metallothionein expression in non-small cell lung carcinomas; *Rocz Akad Med Białymst.* 2004;49 Suppl 1:43-5.
- Ebert MP, Günther T, Hoffmann J, Yu J, Miehke S, Schulz HU, Roessner A, Korc M, Malfertheiner P. Expression of metallothionein II in intestinal metaplasia, dysplasia, and gastric cancer *Cancer Res.* 2000 Apr 1;60(7):1995-2001.
- Goldschmidt MH, Dunstan RW, Stannard AA, von Tschärner C, Walder EJ, Yager JA – *Histological Classification of epithelial and melanocytic tumors of the skin of domestic animals – WHO*, 1998
- McGee HM, Woods GM, Bennett B, Chung RS: The two faces of metallothionein in carcinogenesis: photoprotection against UVR-induced cancer and promotion of tumour survival; *Photochem Photobiol Sci.* 2010 Apr;9(4):586-96.
- Meuten Donald J.: *Tumors in Domestic Animals. IV Edizione, 2002*
- Misdorp W: Histologic classification and further characterization of tumours in domestic animals. *Adv Vet Sci Comp Med* 20:191-221, 1976
- Ogra Y, Suzuki KT: Nuclear trafficking of metallothionein: possible mechanisms and current knowledge; *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2000 Mar;46(2):357-65.
- Tan Y, Sinniah R, Bay BH, Singh G: Metallothionein expression and nuclear size in benign, borderline, and malignant serous ovarian tumours; *J Pathol.* 1999 Sep;189(1):60-5.

	NUMERO DI CASI
NEOPLASIE BENIGNE	
ADENOMA APOCRINO	5
ADENOMA DUTTALE APOCRINO	1
ADENOMA MISTO E/O COMPLESSO	3
TOTALE	9
NEOPLASIE MALIGNI	
CARCINOMA APOCRINO	6
CARCINOMA DUTTALE APOCRINO	3
CARCINOMA MISTO E/O COMPLESSO	2
TOTALE	11

Tabella 1: Classificazione dei tumori in base ai criteri del WHO (Misdorp, 1976).

	Numero di tumori	Classificazione dei tumori in base alla positività immunohistochimica all'anticorpo anti MT			
		-	+	++	+++
Tumori benigni	9		1/9	8/9	
Tumori maligni	11			3/11	8/11

Tabella 2: Classificazione dei tumori in base alla positività immunohistochimica all'anticorpo anti MT.

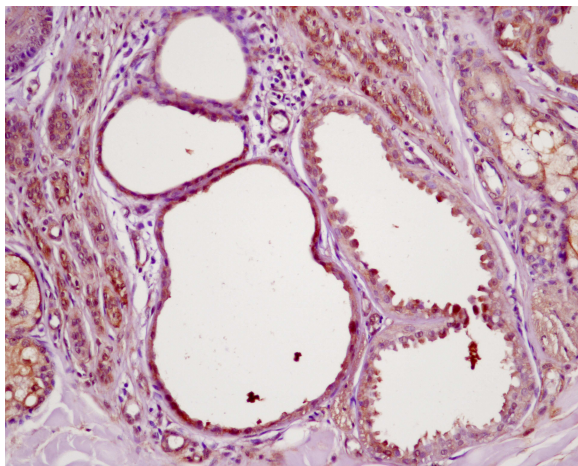


Figura 1: Ghiandole apocrine cutanee normali.

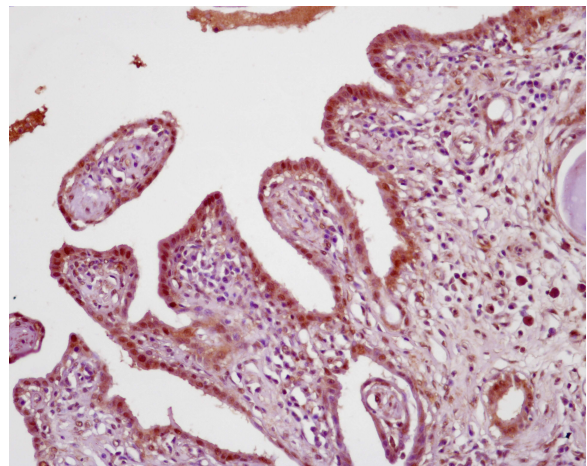


Figura 2: Adenoma cistico apocrino: positività variabile, da lieve e sporadica, a forte e diffusa, prevalentemente citoplasmatica (20 X).

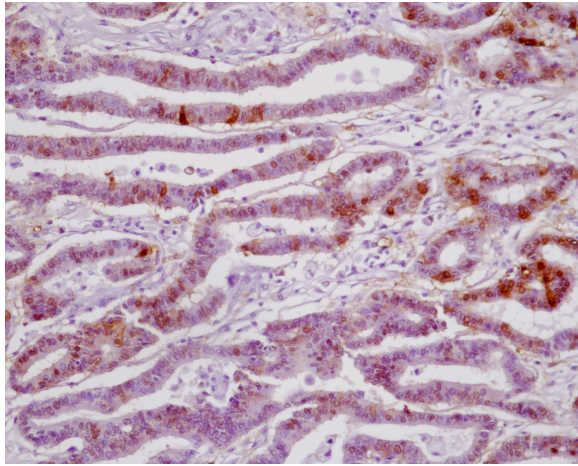


Figura 3: Adenocarcinoma tubulare apocrino ben differenziato: positività citoplasmatica, a volte nucleare, in alcune cellule epiteliali tubulari (20X).

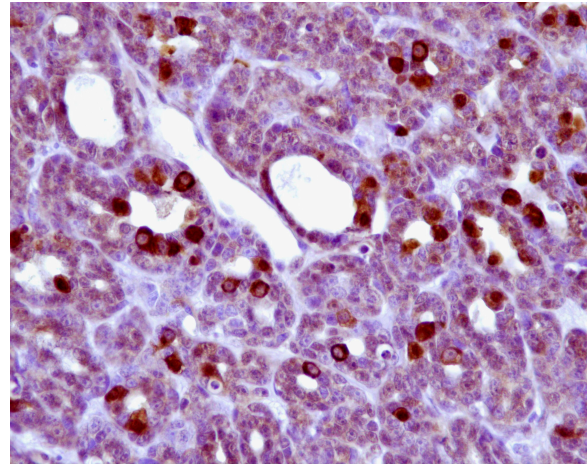


Figura 4: Adenocarcinoma tubulare apocrino mediamente differenziato: aumento progressivo del numero di cellule positive all'anticorpo anti-MT. Evidenti singole cellule con forte positività sia nucleare che citoplasmatica, all'interno di nidi neoplastici negativi (aspetto cosiddetto a mosaico) (20X).

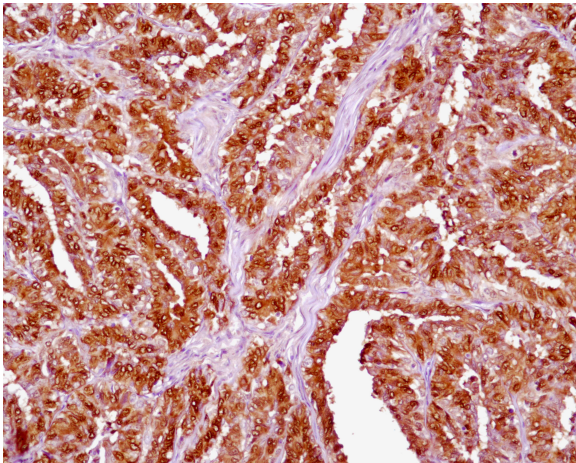


Figura 5: Adenocarcinoma tubulare apocrino scarsamente differenziato: positività intensa nella maggior parte delle cellule neoplastiche (20X).

METALLOTHIONEIN (MT-1) EXPRESSION IN CANINE APOCRINE GLAND TUMORS

Metallothioneins (MTs) are low molecular weight proteins with high cysteine content, exhibiting a selective binding affinity for heavy metals. They are involved in numerous physiological and pathological processes, and in recent years their role in carcinogenesis and their potential application in the prognosis of human neoplasia have received increased attention. To our knowledge, there are only few studies about MTs in veterinary oncology. The aim of this study was to evaluate by immunohistochemistry the expression of MT (MT1) in a series of formalin fixed and paraffin embedded canine apocrine glands (normal glands, adenomas, adenocarcinomas). MT1 expression resulted higher in malignant adenocarcinomas than in normal glands and benign neoplasia as in human neoplasia. These results confirm the important role of MTs in the induction and progression of malignancy, and indicate that further studies are necessary to examine biological functions of MTs in cancer.

Key words: metallothionein, apocrine glands, dog.

UTILITÀ DELL'ANALISI CITOFLUORIMETRICA NELLA DEFINIZIONE DEL COINVOLGIMENTO MIDOLLARE NEI LINFOMI B DEL CANE

Gelain Maria Elena¹, Pintore Laura², Stefanello Damiano³, Marconato Laura⁴, Romanelli Giorgio⁵, Comazzi Stefano¹

¹DIPAV, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Milano, ²SPIV, Facoltà di Medicina Veterinaria, Padova; ³Dipartimento di Scienze Cliniche, Università degli Studi di Milano; ⁵Animal Oncology and Imaging Center, Hunenberg, Switzerland; ⁵Clinica veterinaria Nerviano

La stadiazione del linfoma, con la valutazione del coinvolgimento midollare, è basilare nell'uomo ai fini prognostici e terapeutici e l'uso di tecniche altamente sensibili, come la citometria, permettono una migliore differenziazione all'interno delle categorie prognostiche stabilite dall'International Prognostic Index. La stadiazione del linfoma nel cane avviene con l'uso di tecniche diagnostiche sempre più sensibili che identificano il coinvolgimento di organi prima dell'insorgenza di sintomi. L'interessamento del midollo osseo è stato finora valutato solo morfologicamente, tramite esame istologico o citologico. Scopo di questo lavoro è valutare l'utilità dell'analisi citofluorimetrica nella determinazione dell'infiltrazione midollare nei linfoma B a grandi cellule. Sono stati selezionati casi di linfoma B centroblastico per i quali erano disponibili i dati clinici, clinico-patologici, informazioni sulla terapia e follow-up. Il livello di infiltrazione midollare è stato definito come la percentuale di cellule CD21+ ad elevato forward scatter (FSC). Sono stati analizzati 35 casi di linfomi multicentrici. La percentuale di infiltrazione era $9,2 \pm 14,6$ (mediana 3,2; min-max: 0,3-71,26), in 10 casi era maggiore di 12%, di cui solo 3 oltre 20%. In 25 cani l'infiltrazione era minore di 6%. La mediana del tempo di recidiva era di 163 giorni e la sopravvivenza era di 186 giorni. I tempi di recidiva e sopravvivenza sono stati valutati in funzione del protocollo terapeutico e di 3 diversi livelli di infiltrazione (3,2%, 12%, 20%). Una differenza, seppur non significativa, si è evidenziata nei tempi di sopravvivenza di cani con infiltrazione minore di 3,2% trattati con lo stesso protocollo. Questi dati preliminari indicano come l'uso di tecniche diagnostiche più sensibili possono influenzare lo staging e la prognosi anche nel cane.

Parole chiave: linfoma centroblastico, midollo, citometria.

USEFULNESS OF FLOW CYTOMETRY FOR THE ASSESSMENT OF BONE MARROW INVOLVEMENT IN CANINE B-CELL LYMPHOMA

Staging of non-Hodgkin's lymphoma is routinely performed in humans to determine the extent of the disease, to define the prognosis and establish the therapeutical approach. The detection of bone marrow involvement with high sensitive techniques such as flow cytometry is important prognostic to classify patients within International Prognostic Index categories. In dogs, bone marrow involvement is usually based on the sole morphological evaluation by means of histology or cytology. Aim of the study is to evaluate the usefulness of flow cytometry in the assessment of bone marrow involvement in canine centroblastic B-cell lymphoma and its clinical relevance with regards to patients outcome. Thirty-five cases of centroblastic B-cell lymphoma were selected based on the availability of clinical and clinical-pathological data, information on therapeutical protocol and follow-up. For each case, the percentage of CD21+ cells with high FSC was recorded. The percentage of bone marrow involvement was $9,2 \pm 14,6$ (median 3,2; min-max: 0,3-71,26). In 10 cases, it was higher than 12% (3 cases higher than 20%) and in 25 cases it was lower than 6%. Median disease free interval was 163 days and overall survival (OS) was 186 days. Even if non significant, dogs with less than 3,2% bone marrow involvement had a higher OS with respect to therapy. In agreement with human lymphoma, these preliminary data show that the use of more sensitive techniques to detected neoplastic cells may affect staging and prognosis in dogs.

Key words: centroblastic lymphoma, bone marrow, flow cytometry.

L'USO DELLA CITOLOGIA E DELLA CITOCHIMICA NELLA CARATTERIZZAZIONE DELLE EPATOPATIE DEGENERATIVE NEL CANE

Campora Luca[°], Marchetti Veronica[§], Masserdotti Carlo*, Abramo Francesca[°]

[°] *Dipartimento di Patologia Animale, Profilassi e Igiene degli Alimenti, Università di Pisa* [§]
Dipartimento di Clinica Veterinaria, Università di Pisa * *Laboratorio di Analisi Veterinarie S. Marco, Padova.*

La citologia è una tecnica non invasiva usata frequentemente nella diagnosi delle malattie epatiche. In questo studio da 26 cani con epatopatia degenerativa (gruppo A), infiammatoria (gruppo B) o neoplastica (gruppo C) sono stati ottenuti campioni citologici epatici per agoaspirato eco-guidato. I preparati sono stati sottoposti a colorazione tipo Romanowsky e a 4 differenti colorazioni citochimiche speciali (PAS, PAS con amilasi, Sudan nero e Oil red O). Per ciascun soggetto sono stati valutati gli indici di colestasi e di funzionalità epatica. I preparati citologici sono stati valutati morfologicamente per la presenza di rarefazione citoplasmatica/vacuolizzazione a margini irregolari (riferibile ad accumulo di acqua/glicogeno) o di vacuolizzazione a margini netti (riferibile a steatosi), per la presenza di pigmento intra/extracellulare e per la risposta alle colorazioni citochimiche. Quest'ultime hanno dimostrato la presenza di positività variabili in quadri che la morfologia attribuiva ad uno dei diversi tipi di accumulo citoplasmatico. La presenza di pigmento extracellulare (riferibile a colestasi) è stata rilevata solo in uno dei 14 soggetti con rialzo degli indici di colestasi. I gruppi A e B hanno mostrato prevalente positività al PAS e PAS-amilasi mentre il gruppo C è risultato più frequentemente positivo alle colorazioni per i lipidi. L'insufficienza epatica è stata segnalata più frequentemente nel gruppo B e non è apparsa associata ad un quadro citochimico costante, né particolarmente grave. Gli indici di colestasi erano più frequentemente rialzati nei gruppi B e C. I risultati ottenuti suggeriscono come l'uso della citochimica nella pratica clinica, possa fornire indicazioni utili al veterinario per inquadrare meglio le alterazioni degenerative in corso di epatopatia anche dal punto di vista eziopatogenetico.

Parole chiave: cane, citologia, citochimica, fegato, epatopatia vacuolare.

THE USE OF CYTOLOGY AND CYTOCHEMISTRY IN THE CHARACTERIZATION OF DEGENERATIVE CHANGES IN THE LIVER OF DOGS WITH HEPATOPATHY

Cytology is a non invasive technique used frequently in the diagnosis of liver diseases. In this study from 26 dogs with degenerative (group A), inflammatory (group B) or neoplastic (group C) hepatopathy, echo-guided liver FNB were collected and stained with Romanowsky type and 4 cytochemical special stains (PAS, PAS with amylase, Sudan black and Oil red O). For each subject cholestasis and hepatic function indices were measured. Cytological specimens were morphologically evaluated for the presence of cytoplasmic rarefaction/irregular shaped vacuoles (water/glycogen gain), or regular shaped vacuoles (steatosis), for the presence of intra/extracellular pigment and positivity to the different cytochemical stains. These not often corresponded to the morphological observation. Extracellular pigment was observed in only one out of 14 cases with increased cholestatic indices. Groups A and B were mainly positive for PAS and PAS amylase while in group C the cytoplasmic content was often of lipidic nature. Hepatic failure was frequently detected in group B and was not associated to a specific or particularly severe cytochemical pattern. Cholestatic indices were more frequently increased in groups B and C. The obtained results suggest that the use of cytochemistry in the clinical practice might be useful to better define degenerative changes occurring in hepatocytes of dogs with hepatopathy giving a better insight into the etiopathogenesis of liver diseases.

Key words: dog, cytology, cytochemistry, liver, vacuolar hepatopathy.

LA FIBROSI RENALE NEL CANE: EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION E RUOLO DELLE METALLOPROTEASI 2 E 9

Aresu Luca¹, Benali Silvia¹, Garbisa Spiridione², Gallo Enrico¹, Castagnaro Massimo¹

¹Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata ed Igiene Veterinaria, Università di Padova, viale dell'Università 16, I35020 Agripolis Legnaro (PD), Italy; ²Dipartimento di Scienze Biomediche sperimentali, Università di Padova, viale Colombo 3, Padova, Italia

L'Epithelial Mesenchymal Transition delle cellule tubulari fornisce un contributo fondamentale alla progressione della fibrosi renale: lo scopo di questo studio è stato quello di indagare l'attività enzimatica di diverse metalloproteasi nel cane in un modello di malattia renale cronica mediante tecniche di immunohistochimica e zimografia su gel. Ventotto biopsie renali sono state analizzate attraverso l'esame immunohistochimico con anticorpi diretti contro MMP-9, MMP-2, MMP-13, MMP-14 e TIMP2. Otto casi selezionati sono stati valutati alla zimografia su gel. Un aumentata espressione di MMP-2 è stata osservata in caso di danno tubulo-interstiziale da moderato a grave. La positività per MMP-2 appare localizzata in vescicole in corrispondenza delle aree di splitting della membrana basale tubulare. Negli stessi casi, si è osservata ridotta espressione di MMP-9 e TIMP-2 rispetto ai casi controllo. Lo splitting della membrana basale suggerisce un ruolo attivo di MMP-2 nella degradazione del collagene di tipo IV, principale componente della membrana basale. L'attività gelatinolitica di questo enzima è stata dimostrata attraverso i dati ottenuti dalla zimografia su gel. Questi risultati potranno fornire in futuro in studi sperimentali le basi per prove cliniche che esaminino i possibili benefici dell'utilizzo di inibitori selettivi per MMP-2 in cani con malattia renale cronica.

Parole chiave: fibrosi, MMP-2, splitting, zimografia.

MATRIX METALLOPROTEINASES AND THEIR ROLE IN THE RENAL EPITHELIAL MESENCHYMAL TRANSITION

Tubular cell epithelial-mesenchymal transition (EMT) is a fundamental contributor to renal fibrosis. The aim of this study was to investigate the activity of different matrix metalloproteinases by immunohistochemistry and gel-zymography in a model of chronic canine kidney disease. Immunohistochemistry for antibodies against MMP-9, MMP-2, MMP-13, MMP-14 and TIMP-2 was performed on 28 renal biopsy specimens. Selected cases were chosen for gelatin zymography. In moderate and severe tubulo-interstitial damage, increased expression of MMP-2 was noted. Peculiar staining pattern for MMP-2 in variable-sized vesicles, corresponding to the area of basement membrane splitting, was observed. The immunoexpression of MMP-9 and TIMP-2 was reduced in the same cases, compared to control dogs. The splitting of the membrane suggests an active role of this gelatinase in the disruption of type-IV collagen, the main basement membrane component, confirmed by MMP2 gelatinolytic activity by gel-zymography. These data could provide basis for clinical trials examining the potential benefits of selective MMP-2 inhibitors in dogs with chronic kidney disease.

Key words: fibrosis, MMP-2, splitting, zymography.

ESPRESSIONE DELL' HMW-MAA NEI MELANOMI ORALI CANINI COME POTENZIALE TARGET TERAPEUTICO IN IMMUNOTERAPIA

Maniscalco Lorella, Aricò Arianna, Mayayo Saray, De Maria Raffaella, Buracco Paolo, Biolatti Bartolomeo, Iussich Selina

Dipartimento di Patologia Animale sezione Anatomia Patologica, facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Torino. Via L. Da Vinci, 44 Grugliasco (TO) Tel: 011-6709038.

La diagnosi di melanoma canino, tumore altamente maligno se localizzato a livello orale in quanto caratterizzato da elevata aggressività locale e capacità metastatizzante, implica una prognosi infausta nonostante il recente sviluppo di approcci terapeutici combinati. Tale comportamento clinico-biologico è simile a quello del melanoma maligno umano, tanto da essere considerato un utile modello in patologia comparata. L'antigene ad alto peso molecolare (HMW-MAA) associato al melanoma è utilizzato nell'uomo come target per terapie immunologiche, in cui l'induzione di immunità umorale anti HMW-MAA, seguita da una specifica immunoterapia attiva, è associata a riduzione delle dimensioni della massa e ad un aumento della sopravvivenza. Nel presente studio abbiamo valutato l'espressione immunohistochimica di HMW-MAA in 55 melanomi orali canini e correlato l'espressione con il comportamento clinico e biologico; ne risulta che tale antigene viene espresso nel 58% dei melanomi esaminati e maggiormente in quelli di dimensioni maggiori, suggerendo quindi un potenziale utilizzo di HMW-MAA in protocolli di immunoterapia.

Parole chiave: melanoma orale canino, HMW-MAA, immunoterapia.

EXPRESSION OF HMW IN ORAL CANINE MELANOMA AS THERAPEUTIC TARGET IN I IMMUNOTHERAPY

Canine malignant melanoma is considered an extremely malignant tumor with a high degree of local invasiveness and high metastatic propensity. Although numerous therapeutic strategies have been employed, diagnosis of melanoma remains due to poor prognosis. This biological behaviour is extremely similar to human malignant melanoma so that canine melanoma is considered a therapeutic model in comparative oncology. The high molecular weight melanoma-associated antigen (HMW-MAA) has been used as a target for the immunotherapy of human malignant melanoma. Induction of humoral anti-HMW-MAA immunity following active specific immunotherapy is associated with a statistically significant prolongation of survival and reducing of size mass. We studied immunohistochemical expression of HMW-MAA in 55 canine oral melanomas to correlate it with histological and clinical behaviour. Expression of HMW-MAA was seen in 58% of oral canine melanomas and was correlated with bigger size mass. This suggests a potential use of HMW-MAA in canine melanoma's immunotherapy.

Key words: canine oral melanoma, HMW-MAA, immunotherapy.

ESPRESSIONE DELL'ANTI-MÜLLERIAN HORMONE (AMH) IN CELLULE DEL SERTOLI MATURE, IMMATURE E NEOPLASTICHE DI CANE

Banco Barbara, Bianchessi Federica, Giudice Chiara, Grieco Valeria

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

In medicina veterinaria manca una precisa caratterizzazione immunofenotipica delle cellule del Sertoli canine. Lo studio dei markers cellulari espressi durante il processo maturativo di tali cellule è di fondamentale importanza nello studio del sertolioma ove si è dimostrato il riapparire, nelle cellule neoplastiche, di markers tipici di immaturità.

Lo scopo del lavoro è approfondire lo studio dei markers di immaturità delle cellule del Sertoli valutando l'espressione di AMH in testicoli di cane immaturi, maturi e neoplastici.

Sono state ottenute sezioni da testicoli di: 2 feti, 18 cuccioli neonati, 3 cani impuberi, 6 cani adulti, 20 sertoliomi benigni e 1 sertolioma maligno metastatizzante. E' stato eseguito un esame istologico con EE ed un esame immunistochemico (ABC) con un anticorpo policlonale diretto contro AMH umano (1:30000), seguito da uno scoring semiquantitativo delle cellule marcate.

Dei 21 sertoliomi, 13 si riferivano a forme tipiche, 7 sono stati classificati come "lipid rich". Il sertolioma maligno metastatizzante era caratterizzato da pleomorfismo cellulare, crescita solida e multifocali aree di necrosi ed emorragie.

Per quanto riguarda l'esame immunistochemico, le cellule del Sertoli, sia dei testicoli dei feti che dei neonati, erano sempre fortemente positive ad AMH, mentre nei testicoli dei cuccioli impuberi e negli adulti, le cellule del Sertoli risultavano sempre negative.

Tutti i sertoliomi sono risultati positivi ad AMH. Il numero di cellule positive, però, risultava indipendente dalla morfologia e dal comportamento biologico della neoplasia. Questi dati dimostrano che nei sertoliomi è presente un certo grado di sdifferenziazione cellulare. La capacità delle cellule del Sertoli di ritornare a caratteristiche di immaturità in condizioni patologiche è stata già descritta in letteratura ma meriterebbe approfonditi studi riguardanti il concetto di "maturazione cellulare reversibile".

Parole chiave: testicolo, cellule del Sertoli, cane, immunistochemica, AMH.

ANTI-MÜLLERIAN HORMONE (AMH) IMMUNOHISTOLOGICAL EXPRESSION IN IMMATURE, MATURE AND NEOPLASTIC CANINE SERTOLI CELLS

In veterinary literature immunophenotypical aspects of canine Sertoli cells are poorly investigated. To evaluate the expression of AMH in canine Sertoli cells during testicular maturation and neoplastic transformation, testes from 2 foetuses, 18 newborns, 3 puppies, 6 adult dogs and sections from 20 benign Sertoli cells tumours (SCTs) and 1 metastasizing SCT were processed for histology and immunohistochemistry (ABC method) with antibody against AMH (1:30000).

Histologically, 13/21 SCTs were classified as "classical Sertoli cell tumour" while 7 were considered "lipid rich". Malignant metastasizing SCT was characterized by solid growth, cellular pleomorphism and multifocal areas of necrosis and hemorrhages.

Immunohistochemically, Sertoli cells from foetuses and neonates were always strongly positive for AMH, while in puppies and adults, Sertoli cells were always negative immunolabelled.

All SCTs were positive for AMH. The number of immunostained cells varied independently from tumour morphology and biological behaviour.

The results demonstrate an immature phenotype in neoplastic Sertoli cells, probably due to cellular de-differentiation. The re-expression of immunophenotypical markers of immaturity has been already described in several testicular pathologic conditions and the identification of the mechanisms via which this "cellular reversal maturation" occurs should be further investigated.

Key words: testes, Sertoli cells, dog, Immunohistochemistry, AMH.

MALATTIA DA ACCUMULO DI POLISACCARIDI (PSSM) IN UN CAVALLO DI RAZZA SELLA ITALIANA

Sforna Monica, Pavone Silvia, Prato Stefano, Mandara Maria Teresa

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

Riassunto

Le miopatie da sforzo costituiscono un capitolo fondamentale delle malattie metaboliche del cavallo nell'ambito delle quali si riconoscono diverse forme e convergono varie entità cliniche non sempre ben definite. La malattia da accumulo di polisaccaridi (PSSM), in particolare, rappresenta una forma di glicogenosi caratterizzata dall'accumulo abnorme di glicogeno e di altri polisaccaridi amilasi-resistenti nel citoplasma delle cellule muscolari scheletriche. Viene descritto un caso di PSSM in un cavallo, Sella Italiana, femmina di 10 anni che clinicamente veniva riferito per vari episodi di "tying up" verificatisi con cadenza sempre più frequente negli ultimi tre anni. Gli esami ematobiochimici avevano messo in evidenza una lieve anemia ed un modesto aumento dei livelli serici di CK (1246U/I) e di LDH (524 U/I). L'esame istologico, eseguito su biopsia del muscolo semimembranoso, consentiva di evidenziare la presenza di accumuli intracitoplasmatici e subsarcolemmali di materiale debolmente basofilo in E-E e intensamente positivo alla PAS. In seguito a digestione con amilasi si rilevava un accumulo intracitoplasmatico di materiale amilasi-resistente nella maggior parte delle fibrocellule, mentre i depositi subsarcolemmali, presenti in quantità minore, erano più spesso amilasi-sensibili e quindi riferibili a glicogeno. La reazione con ATP-asi evidenziava un coinvolgimento prevalente delle fibre tipo II. Recentemente sono state proposte due forme di PSSM: una associata ad una mutazione del gene GYS-1, codificante per la glicogeno-sintasi del muscolo scheletrico e a prevalente accumulo intrasarcolemmatico, indicata come PSSM tipo 1, ed un'altra, priva di mutazione, indicata come tipo 2. Il nostro caso, pertanto, appare istologicamente compatibile con una PSSM di tipo 1. Sono tuttavia necessarie ulteriori indagini biomolecolari per la ricerca della mutazione del gene GYS-1 al fine di definire con esattezza il tipo di miopia da accumulo in atto e l'eventuale inserimento del Sella Italiana tra le razze suscettibili a PSSM di tipo 1.

Parole chiave: Sella Italiana; miopia; polisaccaridi; PSSM; GYS-1.

POLYSACCHARIDE STORAGE MYOPATHY IN A SELLA ITALIANA HORSE

Polysaccharide storage myopathy (PSSM) represents a glycogenosis characterized by an abnormal accumulation of glycogen and other amylases-resistant polysaccharides in skeletal muscles. A case of PSSM is described in a female 10-year-old Sella Italiana horse showing recurrent episodes of "tying up" during the last 3 years. Biopsy from the semimembranosus muscle showed cytoplasmic and subsarcolemmal accumulations of PAS-positive material. After digestion with amylases the cells revealed more frequently cytoplasmic amylases-resistant accumulations, while subsarcolemmal deposits, present in smaller quantities, were more diffusely amylases-sensitive. ATP-ase reaction revealed that prevalent fibres involved were type II fibres. A mutation of GYS-1 gene has been reported strictly related to PSSM with an intracytoplasmic pattern of storage. This new form of glycogenosis is proposed as PSSM type 1, while the form negative for GYS-1-mutation is considered as type 2. Based on the main histological pattern of distribution observed for amylase-resistant deposits, our case seems to be consistent with PSSM type 1. However, we need further biomolecular investigations to established if GYS-1 mutation occurs also in Sella Italiana horse.

Key words: Sella Italiana; myopathy; polysaccharides; PSSM; GYS-1.

INFEZIONE DISSEMINATA DA *Mycobacterium avium* IN UN BASSET HOUND IN ITALIA

Campora Luca[°], Zullino Cristina*, Corazza Michele[§], Ebani Valentina[°], Abramo Francesca[°]

[°] Dipartimento di Patologia Animale, Profilassi e Igiene degli Alimenti, Università di Pisa *
Libero Professionista, Montecatini Terme (PT) - [§] Dipartimento di Clinica Veterinaria, Università di Pisa

In questo lavoro viene descritto, per la prima volta in Italia, un caso d'infezione disseminata da *M. avium* in un Basset Hound strettamente imparentato con una linea di sangue americana. Un Basset Hound, femmina intera di 2 anni, con una storia clinica contraddistinta dal susseguirsi di svariate malattie già a partire dai primi mesi di vita, è stata presentata con linfadenopatia persistente e zoppia. Un esame citologico per agoaspirazione dal linfonodo popliteo rilevava una linfadenite granulomatosa e la presenza di rari bacilli intracitoplasmatici, non colorati, risultati successivamente ZN positivi; la diagnosi emessa è stata di micobatteriosi. Gli esami di diagnostica per immagine hanno evidenziato una linfadenopatia mediastinica e viscerale. Data l'estensione ed il potenziale zoonosico della malattia il cane è stato sottoposto ad eutanasia. Alla necropsica è stata osservata linfadenopatia generalizzata con presenza di aree incapsulate di necrosi caseosa nel linfonodo mediastinico craniale. All'istologia sono state osservate inoltre lesioni granulomatose in milza e fegato. Bacilli bastoncellari ZN positivi sono stati osservati in tutti i linfonodi esaminati, fegato, milza, midollo spinale e polmone. La speciazione dei batteri come *M. avium* è stata effettuata da campioni di linfonodo e di fegato mediante coltura batterica e indagini di biologia molecolare. L'efficienza del sistema immunitario di questo soggetto non è stata indagata, tuttavia, la segnalazione in letteratura di casi analoghi in Basset Hound negli USA, la stretta consanguineità con una linea genealogica americana, e la storia patologica del soggetto, suggerisce uno stato d'immunodeficienza specifica nei riguardi di microrganismi del genere *Mycobacterium* sp a carattere ereditario.

Parole chiave: cane, sistema immunitario, *Mycobacterium avium*, Basset Hound.

DISSEMINATED *Mycobacterium avium* INFECTION IN A BASSET HOUND IN ITALY

In this report we describe the first case of disseminated *M. avium* infection in Italy occurred in a Basset Hound whose genealogy was closely correlated with Basset Hounds reported to be infected in the USA. A 2-year-old female entire Basset hound dog was presented with persistent lymphadenopathy, lameness, and a history characterized by various diseases. A popliteal FNB was performed and showed lymphadenitis with macrophages containing a few intracytoplasmic negative-staining rod-shaped bacilli which were positive at ZN stain. Diagnosis of Mycobacteriosis was made. Imaging diagnostic revealed visceral and mediastinic lymphadenopathy. Due to the extension of the disease and the zoonotic implication of the disease, the dog was humanly euthanized. At necropsy, the significant gross abnormalities were enlargement of the cranial mediastinal lymph nodes with encapsulated areas of caseous necrosis and generalized lymphadenopathy. At histology granulomatous lesions were also seen in liver and spleen. ZN positive rod-shaped bacilli were seen in all lymph nodes, liver, spleen, bone marrow and lungs. Lymph node and liver tissues were collected to performed culture and molecular biology for speciation and the pathogens were identified as *M. avium*. Although the immune system efficiency was not indagated, the dog history may suggest it was immunocompromised. The close consanguinity with the American lineage of Basset Hound already reported to be predisposed to the infection, further suggest the hereditary character of the immunodeficiency.

Key words: dog, immune system, *Mycobacterium avium*, Basset Hound.

NEOPLASIE DEL BOVINO: INDAGINE ANATOMO-ISTOPATOLOGICA SU VACCHE A FINE CARRIERA REGOLARMENTE MACELLATE

Capucchio Maria Teresa, Bianco Paolo, Ragazzoni Luisa, Catalano Deborah, Bollo Enrico, Valenza Federico, Guarda Franco

Università degli Studi di Torino

Negli animali da reddito, benché sporadiche e sottostimate, le neoplasie possono rappresentare utili indicatori biologici dello stato di salute ambientale. Utilizzando il macello come osservatorio epidemiologico, il presente lavoro ha voluto indagare quali fossero le più comuni neoplasie nelle vacche a fine carriera (4-13 anni) confrontando i quadri macroscopici con i reperti istologici. Nel periodo dal 2003 al 2009 n. 143 organi con lesioni sospette neoplastiche sono stati sequestrati in sede di macellazione ed inviati al Dipartimento di Patologia Animale dell'Università di Torino per l'esame istologico. Indagini immunohistochimiche sono state eseguite su casi selezionati per la conferma diagnostica (citocheratine, vimentina, S100, GFAP, actina, CD3 e CD79). In 89 lesioni sono state confermate alterazioni di tipo neoplastico. I tumori più frequenti erano rappresentati dalle metastasi di linea epiteliale (41%), dai linfomi B (30%) e dai carcinomi dei dotti biliari (21%). Tra gli altri tumori rilevati più frequentemente vanno ricordati i tumori dei nervi periferici (n. 5), i mixomi e sarcomi mixoidi (n. 5), i mesoteliomi (n. 3) e i carcinomi squamosi perioculari (n. 2). Gli organi più colpiti erano il fegato, i linfonodi, il polmone, il rene, il cuore e la tiroide. In 54 lesioni non si sono evidenziate alterazioni di tipo neoplastico; in particolare si trattava di lesioni spleniche (flogosi o ematomi) e di infiammazioni croniche con estesa fibrosi soprattutto a livello di rene, fegato, polmone e linfonodi. Gli studi sulle neoplasie dei bovini sono poco sviluppati benché questa specie animale potrebbe rappresentare un ottimo indicatore di rischio ambientale. L'attività scrupolosa del veterinario ispettore è in tal senso fondamentale per il rilievo di forme patologiche sub-cliniche potenzialmente pericolose per il consumatore o comunque essenziali per studi di oncologia e patologia comparata.

Parole chiave: Vacche, tumori, esame macroscopico, istologia.

TUMOURS OF CATTLE: PATHOLOGICAL INVESTIGATIONS ON REGULARLY SLAUGHTERED COWS

Tumours in large domestic animals are rarely reported, but should represent important biological indicators of the environmental health. Using the slaughterhouse as epidemiological observatory the present research investigated the most common tumours of cattle (4-13 years old cows) comparing macroscopical and histological features. From 2003 to 2009 no. 143 organs with suspected neoplastic lesions were submitted to the Department of Animal Pathology of the University of Torino (Italy) for histological investigations. Immunohistochemical stainings were performed on selected cases. Eighty-nine cases were confirmed as tumours with an incidence of 0.25%. The most frequent were epithelial metastasis (41%), type B lymphomas (30%), and biliary duct carcinomas (21%). Moreover 5 peripheral nerve sheaths tumours, 5 mixomas or mixoid sarcomas, 3 mesotheliomas and 2 ocular carcinomas were reported. Liver, lymph nodes, lung, kidney, heart and thyroid were the more frequently involved organs. Fifty-four lesions were not neoplastic, represented by different spleen lesions and chronic inflammations in several organs (kidney, liver, lung and lymph nodes). Few studies are reported in literature on cattle tumours even if this species could represent an optimal indicator of environmental risk. Veterinary activity at the slaughterhouse is crucial for the detection of sub-clinical pathological cases potentially dangerous for the consumer or to improve oncological and pathological studies.

Key words: Cows, tumours, gross lesions, histology.

PRESENTAZIONE DEL PROGETTO “SHARING MOLECULAR TECHNIQUES FOR FOOD BORNE PATHOGEN DETECTION” (FoBoS)

Ceciliani Fabrizio^{ab}, Bonastre Armand Sanchez^c, Karus Avo^d, Lecchi Cristina^a, Pisani Laura Francesca^a, Castiglioni Bianca^e

^a Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, via Celoria 10, 20133 Milano, Italy. ^b CISMA Centro Interdipartimentale di Studi sulla Ghiandola Mammaria, Università degli Studi di Milano, via Celoria 10, 20133 Milano, Italy. ^c Universitat Autònoma de Barcelona, Department of Animal and Food Science. Molecular Genetics Veterinary Service, Edifici V, Campus de la UAB, Bellaterra Cerdanyola del Vallès, Spain. ^d Estonian University of Life Science, Department Food Science and Hygiene, Institute of Veterinary Medicine and Animal Science, Veski 13, Tartu, Estony. ^e Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto di biologia e biotecnologia agraria, c/o Parco Tecnologico Padano, via Einstein, Loc. Cascina Codazza, 26800 Lodi, Italia

Il progetto “Sharing molecular techniques for food-borne pathogen detection” (acromino FoBoS), si propone di mettere a punto procedure molecolari per l’identificazione di patogeni nel latte e in altri generi alimentari. FoBoS è collocato all’interno del progetto “Innovation4Welfare” (INTERREG IVc) ed ha come principale obbiettivo quello di migliorare la qualità della vita sviluppando ed applicando sistemi di identificazione precoce di patogeni alimentari. Il progetto raccoglie tre gruppi di ricerca universitari e cinque partners industriali con missioni differenti. Lo scopo sarà quello di analizzare, applicare e trasferire un protocollo basato su DNA-array che hanno già dimostrato un notevole successo per la diagnosi di batteri responsabili di mastiti nel latte e nel campo dell’analisi degli alimenti.

FoBoS prevede la messa a punto del protocollo per l’identificazione dei patogeni negli alimenti e in alcune matrici alimentari come latte e carni. Tali procedure ottenute al termine del WP2 saranno trasferite alle aziende agro-alimentari e alle compagnie che distribuiscono pasti pronti ed inoltre saranno proposti ad aziende interessate al potenziamento degli Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP).

I risultati di FoBoS potranno esserre applicati come “buone pratiche” al fine di rafforzare le politiche regionali di sicurezza alimentare attraverso l’applicazione di DNA-array. Grazie all’applicazione di questa nuova e versatile tecnologia ed anche alla partecipazione di un consorzio di aziende pubbliche e private di vario genere, FoBoS propone nuove possibilità commerciali applicando nuovi prodotti e servizi.

Parole chiave: Patogeni alimentari, DNA-array, sicurezza alimentare.

PRESENTATION OF THE PROJECT “SHARING MOLECULAR TECHNIQUES FOR FOOD BORNE PATHOGEN DETECTION” (FoBoS)

The project “Sharing molecular techniques for food-borne pathogen detection” (acronym FoBoS), directly aims to set up a molecular procedure to detect pathogens in milk and foodstuffs. The project is casted inside the mainframe of “Innovation4Welfare” project (INTERREG IVc), whose objectives are improving the quality of life by developing a good practice useful for food-borne pathogen early detection. The project gathers a team in which three University research groups blend with five private company Partners with different missions (from agro-food industries to meal preparation and distribution public companies). Their aims will be to analyze, implement and transfer a DNA-array based protocol to the field of food analysis.

In a first step, the protocol will be customized to food-borne pathogen detection and several kinds of food matrices. In a second phase, the procedure will be implemented in an industrial context. The protocols validated at the end of WP2 will be transferred to the agro-food and meal distribution companies, as well as other relevant and interested stakeholders for their implementation on Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) and other food-chain critical points.

The expected result of FoBoS will be a new and innovative good practice, which will improve the effectiveness of regional food safety policies through the implementation of a DNA-array based procedure. Thanks to the application of this new and versatile technology, and the participation in the consortium of several typologies of private and public companies, FoBoS will also encourage new business opportunities focussed into innovative new products and services.

Key words: Foodborne pathogen, DNA-array, food safety.

PRESENZA DI ZINCO IN CIPRINIDI DI UN'ASTA FLUVIALE DELLA CALABRIA: RILIEVI CHIMICI E OSSERVAZIONI ISTO-MORFOLOGICHE

**De Bonis Salvatore¹, Favorito Rossana², Ferrandino Ida², Consiglio Grimaldi Maria²,
Coppola Marco¹, Di Napoli Aurelio¹, Melluso Giovanni¹**

¹ *Dipartimento di Biologia Strutturale e Funzionale, Università degli Studi di Napoli Federico II, Via Cinthia, Monte Sant'Angelo, Napoli.* ² *Dipartimento delle Scienze Biologiche, Università degli Studi di Napoli Federico II, Via Mezzocannone 8, 80134, Napoli.*

Nel presente studio sono riportati i risultati preliminari di rilievi chimici, correlati ad osservazioni isto-morfologiche, effettuati nei seguenti ciprinidi: Barbo (*Barbus barbus*), Carpa (*Ciprinus carpio*) e Carassio (*Carassius carassius*). Tutti gli esemplari, 6 per ogni specie, sono stati prelevati vivi direttamente lungo il corso di un'asta fluviale della Calabria. Quattro esemplari di *Carassius auratus*, provenienti da un'attività commerciale di acquariologia, sono stati utilizzati come controllo.

Campioni di fegato e branchie sono stati sottoposti in parte ad indagini tossicologiche e chimiche di routine ed in parte processati per le indagini istologiche. Il contenuto di metalli è stato valutato mediante Spettrofotometria ad Assorbimento Atomico. Le osservazioni isto-morfologiche sono state effettuate mediante l'impiego delle colorazioni Emallume-Eosina e Tricromia di Mallory. Dai risultati si è evidenziato che nei soggetti provenienti dall'asta fluviale è presente un'alta concentrazione di zinco, con valori variabili di 300 ÷ 350 mg/kg di campione, rispetto ai controlli, che presentano valori di 25 ÷ 35 mg/kg di campione; inoltre nell'acqua è stata rilevata la presenza di scarichi puntuali, che hanno dato valori di concentrazione di zinco fino a un massimo di 335 mg/l. I risultati riguardo l'indagine istologica mostrano che nelle branchie e nel fegato, dei soggetti provenienti dall'asta fluviale, sono presenti evidenti anomalie isto-morfologiche. Tali alterazioni sono probabilmente correlabili all'azione tossica dello zinco dal momento che concentrazioni di questo metallo particolarmente elevate sono state riscontrate proprio in questi organi. I risultati ottenuti indicano la necessità di continuare il monitoraggio di questo elemento sulle diverse matrici ambientali, anche al fine di limitare gli effetti indotti per biomagnificazione sugli organismi che costituiscono la catena trofica, di cui l'uomo ne rappresenta il vertice.

Parole chiave: tossicologia, ciprinidi, zinco.

INTRODUZIONE

Gli ecosistemi acquatici sono sempre più esposti ad inquinamento da metalli pesanti a causa di numerose attività agricole ed industriali. I metalli contaminano la superficie delle acque, i sedimenti e soprattutto le forme viventi ivi presenti¹. La vulnerabilità degli habitat acquatici è ormai nota², e numerosi studi eco-tossicologici si occupano di monitorare lo stato di salute delle acque per analizzare tale problematica e limitare le fonti d'esposizione. L'inquinamento da metalli pesanti è un importante problema ambientale³ poiché metalli come cadmio, piombo, cromo, rappresentano alcune delle sostanze tossiche più pericolose che possono bioaccumularsi⁴. Altri metalli pesanti, come lo zinco (Zn), denominati micronutrienti, in quanto risultano essenziali alla nutrizione e alla crescita di piante ed animali, possono mostrarsi nocivi nel caso in cui le loro concentrazioni superino determinate soglie. Lo Zn è impiegato in molteplici lavorazioni e può essere introdotto nei sistemi acquatici come conseguenza delle attività umane che coinvolgono estrazione mineraria, trattamento o uso di metalli, produzione di leghe ferrose e non⁵. È noto che i pesci tendono ad accumulare i metalli pesanti nei loro tessuti, in quantità superiore rispetto ai valori presenti nell'ambiente^{6,7}, in quanto continuamente assorbono tali elementi dalle branchie e attraverso cibo contaminato. I pesci quindi sono costantemente esposti a sostanze inquinanti⁸ e possono essere utilizzati come ottimi bioindicatori di metalli pesanti in acque contaminate^{9,10,11}. È quindi importante analizzare il contenuto di metalli in specie commerciali per valutare i potenziali livelli tossici sulla nutrizione umana^{12,13}. Numerosi studi hanno dimostrato che in fiumi contenenti un'elevata quantità di Zn i pesci presentavano un elevato accumulo di tale metallo^{14,15}. In generale i metalli si accumulano in differenti tessuti dei pesci mostrando significative differenze. Possono accumularsi nell'encefalo¹⁶, nelle branchie e muscoli, ma in molti pesci è il fegato l'organo che mostra un'alta capacità di accumulo^{17,18}. Il metallo accumulandosi induce numerosi danni tissutali, ad esempio Hemalatha e Banerjee¹⁹ riportano che nel pesce gatto, *Heteropneustes fossilis*, il cloruro di zinco provoca gravi lesioni all'epitelio branchiale. Mentre in *Barbus capito pectoralis* e *Chondrostoma nasus* si è osservato che in presenza di zinco si verificano danni istologici nel fegato e branchie²⁰.

Eseguendo dei rilievi chimici sulle acque di un'asta fluviale della Calabria è stata rilevata la presenza di scarichi puntuali di zinco. Partendo da tali dati, nel presente lavoro, abbiamo voluto analizzare lo stato di bioaccumulo di tale metallo in specie autoctone quali Barbo, Carpa e Carassio, ed inoltre indagare sulla possibilità che questo metallo ha di causare modificazioni strutturali. Lo studio delle alterazioni indotte dall'esposizione all'inquinante è stato eseguito su fegato e branchie, organi responsabili di importanti processi metabolici, principali bersagli dell'azione tossica dei metalli pesanti. Le caratteristiche citologiche degli epatociti e delle cellule branchiali sono ben note e molti dati sono presenti in letteratura riguardo gli effetti degli inquinanti sulla loro morfologia²¹.

MATERIALI E METODI

Esemplari adulti di tre specie di ciprinidi (6 per ogni specie): Barbo (*Barbus barbus*), Carpa (*Ciprinus carpio*) e Carassio (*Carassius carassius*) sono stati prelevati vivi direttamente lungo il corso di un'asta fluviale della Calabria. Quattro esemplari di *Carassius auratus*, provenienti da un'attività commerciale di acquariologia, sono stati utilizzati come controllo. Gli esemplari raccolti sono stati anestetizzati in ghiaccio ed immediatamente sacrificati con taglio cervicale. La determinazione del contenuto di metalli nell'acqua è stata effettuata applicando la metodica APAT IRSA CNR, sezione 3000, "Metalli e specie metalliche". I campioni di acqua sono stati prelevati da otto stazioni di campionamento lungo il corso dell'asta fluviale e sono stati conservati a 4 °C fino al momento delle analisi. La determinazione del contenuto di metalli nel fegato e nelle branchie dei pesci è stata eseguita mediante Spettrofotometria ad Assorbimento Atomico (AAS) utilizzando lo strumento Varian AA280FS Atomic Absorption Spectrometer. I campioni sono stati rapidamente prelevati e congelati a -20°C, successivamente sono stati scongelati, omogeneizzati, pesati e analizzati. La metodica utilizzata per la determinazione del metallo è APAT IRSA-CNR, Sezione 3000, "Metalli e specie metalliche", divisione 3010, "Trattamento preliminare dei campioni per l'analisi dei metalli mediante mineralizzazione attraverso il sistema aperto con acido nitrico e cloridrico, analizzati attraverso lo spettrofotometro ad assorbimento atomico in fiamma". Per le indagini istomorfologiche campioni di fegato e branchie sono stati fissati in Bouin per 24 ore, disidratati ed

inclusi in paraffina. Le colorazioni Emallume-Eosina e Tricromia di Mallory sono state applicate su sezioni seriali di 6 µm per studiare eventuali alterazioni isto-morfologiche. Le immagini contenute nel presente lavoro sono state realizzate mediante l'analizzatore di immagine Kontron Elektronik Imaging System KS300 (Zeiss).

RISULTATI

È stato analizzato il contenuto di metalli nell'acqua, nelle branchie e fegato dei ciprinidi Carpa, Barbo e Carassio prelevati in alcune stazioni di campionamento di un'asta fluviale della Calabria e i valori sono riportati nei grafici 1, 2, 3. Nell'acqua è stata riscontrata una cospicua presenza di zinco con picchi puntuali in una delle otto stazioni di campionamento, pari a 335 mg/l (grafico 1). Negli organi dei pesci provenienti dall'asta fluviale lo zinco risulta essere molto concentrato: nella Carpa i valori sono pari a 106,59 mg/Kg nel fegato e 297,76 mg/Kg nelle branchie. Nel Carassio i valori sono pari a 198,22 mg/Kg nel fegato e 56,37 mg/Kg nelle branchie. Nel Barbo i valori sono pari a 74,56 mg/Kg nel fegato e 67,51 mg/Kg nelle branchie (grafico 2 e 3). Nel Carassio aurato, utilizzato come controllo, i valori di zinco erano di 25,4 mg/Kg nelle branchie e 34,6 mg/Kg di campione nel fegato (grafico 4). Riguardo l'indagine istologica i risultati, mostrano che rispetto ai pesci di controllo (Fig. a-f, m-p), nelle branchie e nel fegato dei soggetti provenienti dall'asta fluviale, sono presenti evidenti anomalie isto-morfologiche. Queste anomalie sono notevoli nelle branchie, dove si osservano lesioni branchiali, quali fusioni lamellari, curvatura delle lamelle secondarie e ipertrofia della cartilagine (Fig. g-l). A livello epatico si riscontra un'evidente degenerazione epatica associata a vacuolizzazione, incremento della vascolarizzazione ed ampliamento dei sinusoidi (Fig. m-t).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I risultati del presente studio forniscono preziose informazioni circa il contenuto di metallo presente nei tessuti dei pesci esaminati dall'asta fluviale, e indirettamente, indicano la contaminazione ambientale dell'acqua. Le alterazioni istomorfologiche osservate sono probabilmente correlabili all'azione tossica dello zinco dal momento che concentrazioni di questo metallo particolarmente elevate sono state riscontrate proprio in questi organi. Tali dati

inoltre concordano con altri studi in cui si riporta che lo zinco in elevate concentrazioni induce cambiamenti morfologici in diversi organi di organismi acquatici^{22,23}, come l'ipertrofia delle strutture branchiali, già descritta in pesci esposti da Rajbanshi e Gupta²⁴, Pelgrom et al.²⁵ e Mazon et al.²⁶. Dai dati ottenuti risulta che la concentrazione di zinco differisce negli organi delle tre specie esaminate, ciò è attribuibile probabilmente alle diverse esigenze ecologiche, attività metaboliche e abitudini alimentari. Il Carassio accumula lo zinco maggiormente nel fegato che agisce come organo primario per lo stoccaggio e la disintossicazione, mentre nella Carpa alti livelli sono stati riscontrati nelle branchie, organi anche questi che agiscono come un tessuto di deposito. Yilmaz²⁷ e Nsikak et al.²⁸ hanno osservato che la captazione dei metalli in questi organi è particolarmente aumentata. Possiamo quindi concludere che lo zinco, pur essendo un metallo essenziale, ad alte dosi risulta, comunque, tossico. I risultati ottenuti indicano la necessità di continuare il monitoraggio di questo elemento sulle diverse matrici ambientali, anche al fine di limitare gli effetti indotti per biomagnificazione sugli organismi che costituiscono la catena trofica, di cui l'uomo ne rappresenta il vertice.

BIBLIOGRAFIA

- 1 Linnik PM, Zubenko IB. Role of bottom sediments in the secondary pollution of aquatic environments by heavy-metal compounds. *Lakes and Reservoirs: Research and Management*, 2000, 5, 11-21.
- 2 Koli AK, Whitmore R. Trace elements in fish from the Savannah river near savannah river Nuclear plant. *Environment International*, 1983, Vol. 9, pp. 361-362.
- 3 Rayms-Keller A, Olson KE, McGraw M, Oray C, Carlson JO, Beaty BJ. Effects of heavy metals on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 1998, 39, 41-47.
- 4 Tarifeno-Silva E, Kawasaki L, Yn DP, Gorden MS, Chapman DJ. Aquacultural approaches to recycling dissolved nutrients in secondarily treated domestic wastewater: Uptake of dissolved heavy metals by artificial food chains. *Water Res.*, 1982, 16, 59-65.
- 5 Levi-Minzi R, Riffaldi R. Uso e riciclo delle biomasse. In: Sequi P. (a cura di), *Chimica del Suolo*. Bologna, Patron Editore, 1989, p. 547-566.
- 6 Law RJ. *et al.* Concentrations of trace metals in the livers of marine mammals from waters around

- the British Isles. Mar. Pollut. Bull., 1991, 22, 183–191.
- 7 El-Nabawi A, Heinzow B, Kiruse H. As, Cd, Cu, Pb, Hg and Zn in fish from Alexandria region, Egypt. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 1987, 39, 889–897.
- 8 Dallinger R, Prosi F, Segner H, Black H. Contaminated food and uptake of heavy metals by Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*): A field study. *Oecologia*, 1987, 73, 91–98.
- 9 Jorgenson LA, Pedersen B. Trace metals in fish used for time trend analysis and as environmental indicators. Mar. Pollut. Bull., 1994, 28, 235–243.
- 10 Widianarko B, Van Gestel CAM, Vrerweij RA, Van Straalen NM. Associations between trace metals in sediment, water and guppy, *Poecilia reticulata* (Peters), from urban streams of Semarang, Indonesia. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 2000, 45, 15–34.
- 11 Rashed MN. Monitoring of environmental heavy metals in fish from Nasser Lake. *Environ. Int.*, 2001, 69, 27–33.
- 12 Vazquez FG, Sharma VK. Trace metal in the oyster, *Crassostrea rhizophora*, from the Laguna de Terminos of Campeche, Mexico. *Texas Journal of Science*, 1996, 48, 261–266.
- 13 Vazquez FG, Sharma VK, Alexander VH, Frausto CA. Metals in some lagoons of Mexico. *Environmental Health Perspectives*, 1995, 103, 33–34.
- 14 Schmitt CJ, Brumbaugh WG, Linder GL, Hinck JE. A screening-level assessment of lead, cadmium, and zinc in fish and crayfish from Northeastern Oklahoma, USA. *Environ Geochem Health*. 2006 Oct;28(5):445-71.
- 15 Malik N, Biswas A. K, Qureshi TA, Borana K, Rachna V. Bioaccumulation of heavy metals in fish tissues of a freshwater lake of Bhopal. *viron Monit Assess* 2010, 160:267–276.
- 16 Favorito R, Coppola M, Di Napoli A, Grimaldi MC, Melluso G, Ferrandino I. Effetti dell'esposizione al cadmio nel cervello di *Danio rerio*. In: De Vico G., AIPVET Atti VI congresso nazionale. AIPVET, Napoli 2009: pp.73- 77
- 17 Türkmen M, Ciminli C. Determination of metals in fish and mussel species by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. *Food Chemistry*, 2007, 103, 670–675.
- 18 Yılmaz F, Özdemir N, Demirak A, Tuna AL. Heavy metal levels in two fish species *Leuciscus cephalus* and *Lepomis gibbosus*. *Food Chemistry*, 2007, 100, 830–835.
- 19 Hemalatha S, Banerjee TK. Histopathological analysis of sublethal toxicity of zinc chloride to the respiratory organs of the airbreathing catfish *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Biol Res*. 1997, 30(1):11-21.
- 20 Koca S, Koca YB, Yildiz Ş, Gürcü B. Genotoxic and Histopathological Effects of Water Pollution on Two Fish Species, *Barbus capito pectoralis* and *Chondrostoma nasus* in the Büyük Menderes River, Turkey. *Biol Trace Elem Res*, 2008, 122:276–291.
- 21 Wong MH, Luk KC, Choi KY. The effects of zinc and copper salts on *Cyprinus carpio* and *Ctenopharyngodon idellus*. *Acta Anat (Basel)* 1977, 99(4):450-54.
- 22 Costa PM, Diniz MS, Caeiro S, Lobo J, Martins M, Ferreira AM, Caetano M, Vale C, DelValls TA, Costa MH. Histological biomarkers in liver and gills of juvenile *Solea senegalensis* exposed to contaminated estuarine sediments: a weighted indices approach. *Aquat Toxicol*. 2009;92(3):202-12.
- 23 Wu JP, Chen HC, Huang DJ. Histopathological alterations in gills of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone) after acute exposure to cadmium and zinc. *Bull Environ Contam Toxicol*. 2009, 82(1):90.
- 24 Rajbanshi VK, Gupta AK. Alterations in the architecture of gill surface produced by water borne copper in *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Acta hydrochim et hydrobiol*, 1988, 16, 325-332.
- 25 Pelgrom SM, Lamer JAM, Garritsen BM, Pels RAC, Lock P, Balm SE. Wendelaar Bonga: Interactions between copper and cadmium during single and combined exposure in juvenile tilapia *Oreochromis mossambicus*: Influence of feeding condition on whole body metal accumulation and the effect of the metal on tissue water and ion content. *Aquatic Toxicol* 1994: 30, 117-135.
- 26 Mazon AF, Cerqueira E, Monteiro M, Fernandez N. Acute copper in Fresh-water fish: morphological and physiological effects. In: *Biology of Tropical Fishes* (Val, Almeida-Val, Eds.). INPA, Manaus, Brazil. 1999, pp. 261-275.
- 27 Yilmaz AB. Comparison of heavy metals of grey mullet (*Mugil cephalus* L.) and sea bream (*Sparus aurata* L.) caught in Iskenderun Bay (Turkey). *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 2005, 29, 257– 262.
- 28 Nsikak UB, Joseph PE, Akan BW, David EB. Mercury accumulation in fishes from tropical aquatic ecosystems in the Niger Delta, Nigeria. *Current Science*, 2007, 92(6), 781–785.

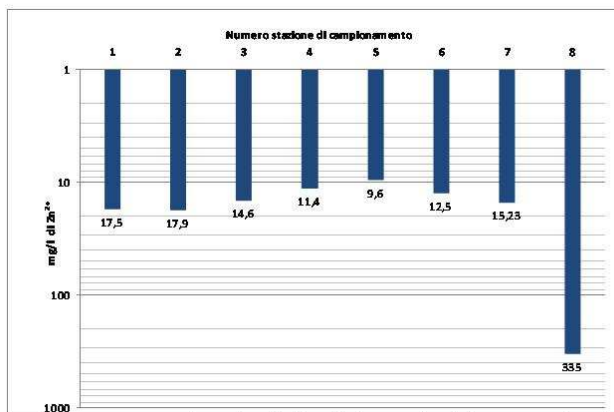


Grafico 1: Concentrazione (mg/l) di Zn²⁺ in campioni di acqua prelevati da otto stazioni lungo il corso di un'asta fluviale della Calabria.

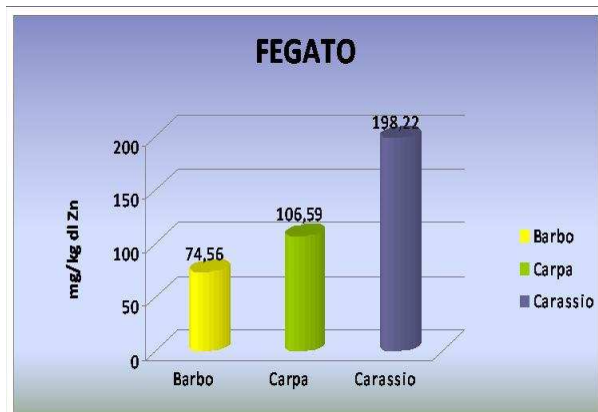


Grafico 2: Concentrazione (mg/kg di campione) di Zn nel fegato di Barbo, Carpa e Carassio dell'asta fluviale.



Grafico 3: Concentrazione (mg/kg di campione) di Zn nelle branchie di Barbo, Carpa e Carassio dell'asta fluviale.

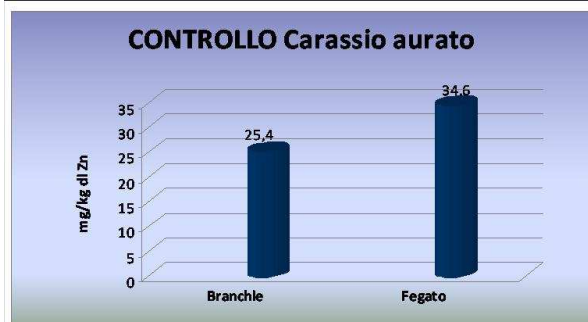


Grafico 4: Concentrazione (mg/kg di campione) di Zn nel fegato e branchie di Carassio aurato, utilizzato come controllo.

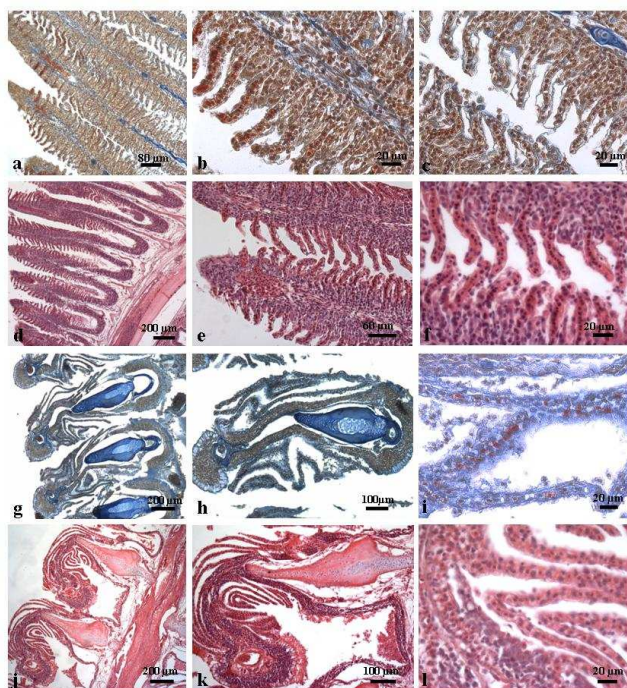


Figure a,b,c: colorazione tricromica di Mallory, branchie, *Carassius auratus* controllo.
 Figure d, e, f: colorazione emallume-eosina, branchie, *Carassius auratus* controllo.
 Figure g, h, i: colorazione tricromica di Mallory, branchie, Barbo. Sono evidenti notevoli anomalie come ipertrofia della cartilagine e fusioni lamellari.
 Figure j, k, l: colorazione emallume-eosina, branchie, Barbo. E' evidente la curvatura delle lamelle secondarie.

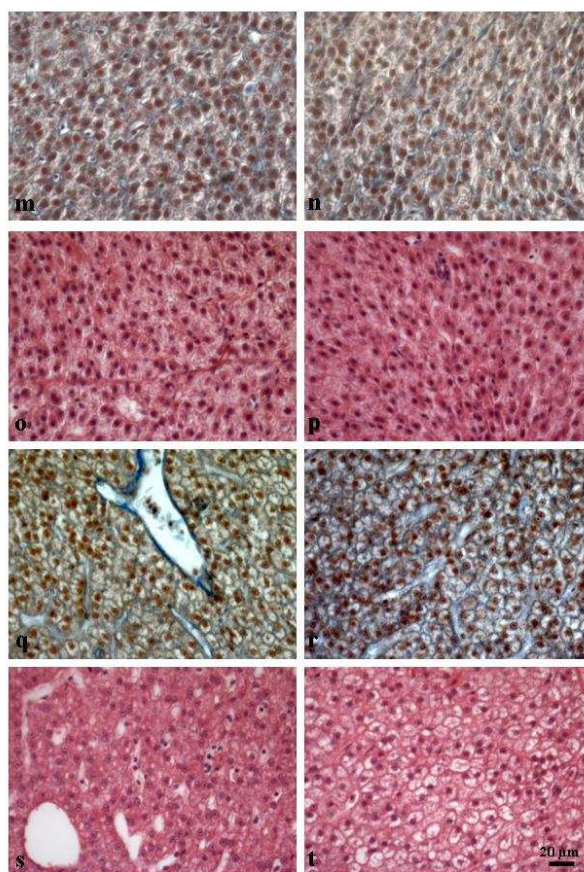


Figure m, n: colorazione tricromica di Mallory, fegato, *Carassius* controllo.
 Figure o, p: colorazione emallume-eosina, fegato, *Carassius* controllo.
 Figure q, r: colorazione tricromica di Mallory, fegato, Barbo. Evidente ampliamento dei sinusoidi e processi di degenerazione epatica.
 Figure s, t: colorazione emallume-eosina, fegato, Barbo. Si nota vacuolizzazione ed incremento della vascolarizzazione. Figure m-t barra 20 µm.

ZINC IN CYPRINIDS FROM A RIVER OF CALABRIA: CHEMICAL AND HISTOLOGICAL FINDINGS

The aim of this study was to describe the chemical and histomorphological findings in six *Barbus barbus*, six *Ciprinus carpio*, six *Carassius carassius* from a river of Calabria. Besides four *Carassius auratus* from commercial activity were utilized like control. In subjects taken by the river severe lesions were found in the gills and liver. These histological alterations were associated to high level of zinc too (300 ÷ 350 mg/kg of sample, compared to controls which had values of 25 ÷ 35 mg/kg of sample). The results show the need for continued monitoring of this element on the different environmental matrices, and in order to limit the effects on organisms that led to biomagnification up the food chain, of which man represents the summit.

Key words: toxicology, cyprinids, zinc.

REPERTI ANATOMO-ISTOPATOLOGICI, IMMUNOISTOCHEMICI E PARASSITOLOGICI IN CETACEI RINVENUTI SPIAGGIATI SULLE COSTE ITALIANE DAL 1998 AL 2009

Di Guardo Giovanni (1), Marruchella Giuseppe (1), Proietto Umberto (1), Di Francesco Cristina Esmeralda (1), Zucca Paolo (1), Pennelli Massimiliano (1), Mignone Walter (2), Tittarelli Cristiana (2), Casalone Cristina (2), Iulini Barbara (2), Bozzetta Elena (2), Garibaldi Fulvio (3), Scaravelli Dino (4), Mazzariol Sandro (5), Fico Rosario (6), Eleni Claudia (6), Kennedy Seamus (7), Di Cesare Angela (1), Traversa Donato (1)

(1) Università di Teramo, Facoltà di Medicina Veterinaria; (2) Istituto Zooprofilattico Sperimentale (IZS) del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta; (3) Università di Genova, Dip.Te.Ris.; (4) Università di Bologna, Facoltà di Medicina Veterinaria; (5) "Banca Tessuti per i Mammiferi Marini del Mediterraneo", Università di Padova, Facoltà di Medicina Veterinaria; (6) IZS delle Regioni Lazio e Toscana; (7) Agri-Food and Biosciences Institute for Northern Ireland (AFBINI), Belfast, Irlanda del Nord (Regno Unito).

Gli animali spiaggiati rappresentano una ricchissima fonte di informazioni utili a conoscere lo stato di salute delle popolazioni di cetacei che vivono in mare. Ciò premesso, questo lavoro descrive i principali reperti anatomico-istopatologici, immunoistochimici e parassitologici osservati in 53 cetacei odontoceti rinvenuti spiaggiati tra il 1998 e il 2009 sulle coste italiane, 36 dei quali appartenenti alla specie *Stenella coeruleoalba*, 14 alla specie *Tursiops truncatus*, 2 alla specie *Grampus griseus* e 1 alla specie *Delphinus delphis*. A parte i 10 soggetti interessati da avanzati fenomeni autolitici post-mortali (19%), le lesioni più comunemente riscontrate nei rimanenti 43 animali sono state, nell'ordine, le polmoniti (53%), le epatiti (28%), le meningo-encefaliti (23%), le nefriti (16%) e le pancreatiti (14%). Sono stati inoltre osservati 15 casi di (bronco)-polmonite parassitaria da *Halocercus lagenorhynchi* (35%), 7 casi di pancreatite da *Campula* spp. (16%), 1 caso di gastrite da *Pholeter gastrophilus* (2%) e 2 casi di localizzazione sottocutanea e muscolo-scheletrica di cisti di *Phyllobothrium delphini* e *Monorygma grimaldii* (5%). Di particolare interesse è risultata infine la presenza, nel tessuto cerebrale di 2 stenelle striate affette da una grave meningo-encefalite non purulenta, di cisti protozoarie che sono state immunoistochimicamente ascritte a *Toxoplasma (T.) gondii*. Concludendo, sebbene i risultati delle nostre osservazioni siano in linea con quelli disponibili in letteratura, riteniamo tuttavia che l'epidemiologia e la patogenesi dell'infezione da *T. gondii* nei cetacei siano meritevoli di particolare attenzione e interesse.

Parole chiave: Cetacei spiaggiati, patologia, parassitologia, *Toxoplasma gondii*, coste italiane.

ANATOMO-HISTOPATHOLOGICAL, IMMUNOHISTOCHEMICAL AND PARASITOLOGICAL FINDINGS IN CETACEANS FOUND STRANDED ALONG THE ITALIAN COASTLINE (1998-2009)

Stranded animals provide a unique opportunity for monitoring the health status of free-living cetaceans. The main anatomico-histopathological, immunohistochemical and parasitological findings observed in 53 odontocete cetaceans found stranded between 1998 and 2009 along the Italian coastline, including 36 striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*), 14 bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*), 2 Risso's dolphins (*Grampus griseus*) and 1 common dolphin (*Delphinus delphis*), are herein reported. Apart from 10 animals (19% of the total) affected with prominent *post-mortem* autolytic changes, pneumonia (53%), hepatitis (28%), meningo-encephalitis (23%), nephritis (16%) and pancreatitis (14%) were the most commonly detected lesions. Furthermore, 15 cases of *Halocercus lagenorhynchi* pulmonary locations (35%) were observed, together with 7 cases of *Campula* spp. pancreatic locations (16%), 2 cases of *Phyllobothrium delphini* and *Monorygma grimaldii* subcutaneous and musculo-skeletal locations (5%), and 1 case of *Pholeter gastrophilus* gastritis (2%). Finally, 2 striped dolphins affected with a severe non-suppurative meningo-encephalitis showed immunohistochemical evidence of *Toxoplasma (T.) gondii* cysts and zoites in brain tissue.

In conclusion, although the above pathological and parasitological findings are in agreement with those published in the literature, the presence of *T. gondii* in free-living cetaceans provides food for thought for further elucidating the epidemiology and pathogenesis of the infection in these animals.

This work is dedicated to the memory of Prof. Marco PEDONE and is part of a Research Project kindly supported by Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare, as well as by Università degli Studi di Teramo (fondi ex 60% - 2009).

Questo lavoro, dedicato alla memoria del Prof. Marco PEDONE, è stato realizzato grazie ad appositi fondi di ricerca gentilmente concessi da parte del Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare e da parte dell'Università degli Studi di Teramo (fondi ex 60% - 2009).

Key words: Stranded cetaceans, pathology, parasitology, *Toxoplasma gondii*, Italian coastline.

EMORRAGIA INTRAVENTRICOLARE IN UN VITELLO SELEZIONATO DI RAZZA MARCHIGIANA IPERTROFICA

Di Matteo Irene, Pavone Silvia, Lepri Elvio, Vitellozzi Giovanni, Mandara Maria Teresa

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

Viene descritto un caso di grave emorragia encefalica intraventricolare in un vitello Marchigiano ipertrofico, eterozigote per la mutazione del gene miostatina. Tre giorni prima della morte avvenuta spontaneamente, il soggetto ha presentato segni neurologici e crisi respiratorie associate ad intolleranza all'esercizio. Il vitello risultava nato da primipara con parto eutocico e sfuggito all'integrazione post-natale con vitamina E e selenio. L'esame necroscopico ha messo in evidenza lesioni dei muscoli toracici ed appendicolari compatibili con miopatia da carenza di vitamina E e selenio. In sezione longitudinale l'encefalo fissato in formalina, mostrava una grave emorragia intraventricolare, in assenza di trauma cranico. L'esame istologico delle sezioni paraffinate ha evidenziato un grave sanguinamento a livello della matrice germinale, in corrispondenza della testa del nucleo caudato, con presenza di formazioni simil-cistiche contenenti coaguli e isolati vasi trombotici nel parenchima adiacente al sistema ventricolare. Occasionalmente piccole emorragie "ad anello" sono state rinvenute nella corteccia cerebrale associate a necrosi focale delle cellule endoteliali. Non è stata rinvenuta alcuna immaturità morfologica cerebrale. L'emorragia intraventricolare secondaria al sanguinamento della matrice germinale è una patologia che in medicina umana colpisce i neonati prematuri sotto peso, con un'incidenza del 40%. Essa si giustifica con la vulnerabilità dei vasi sanguigni a questo livello, legata al loro stato di involuzione. Tale patologia viene tuttavia descritta anche nei neonati a termine. Nel caso oggetto di studio è stato considerato quale possibile fattore patogenetico dell'ematocefalo secondario ad emorragia della matrice germinale una carenza di fattori antiossidanti, già causa di danno muscolare, verosimilmente amplificata in una razza ipertrofica, eterozigote per la mutazione del gene della miostatina.

Parole chiave: ematocefalo, emorragia intraventricolare, matrice germinale, vitello.

INTRAVENTRICULAR HAEMORRHAGE IN A SELECTED HYPERTROPHIC MARCHIGIANA BREED CALF

A severe intraventricular haemorrhage involving all cerebral ventricular cavities is described in a 42-day-old Marchigiana hypertrophic breed calf heterozygous myostatin gene mutation. Three days before spontaneous death the animal showed neurological and respiratory signs. Feedlot history reported that the animal had escaped from post-natal integration of vitamin E and selenium. *Post mortem* pathological investigations showed thoracic and appendicular muscle lesions consisting in vitamin E and selenium deficiency. No signs of head trauma were present. Longitudinal sections of the fixed brain revealed a severe intraventricular cerebral haemorrhage. At histological examination a severe hemorrhagic bleeding was detected in the germinal matrix of caudate nucleus head associated with cyst-like formations containing blood clots. Occasionally small intraparenchymal perivascular "ring-like" haemorrhages were detected in the cerebral cortex associated with focal endothelial cell necrosis. The calf was born in eutocic labour and no residual immaturity was assessed in the brain.

In this study an antioxidant factor deficiency, probably amplified in a selected hypertrophic breed calf heterozygous for myostatin gene mutation, has been considered a consistent risk factor in producing the germinal matrix haemorrhage and secondary haematocephalus.

Key words: haematocephalus, intraventricular haemorrhage, germinal matrix, calf.

ENCEFALITE DA MORBILLIVIRUS IN UNA STENELLA STRIATA (*Stenella coeruleoalba*) RINVENUTA SPIAGGIATA SULLE COSTE LAZIALI

Eleni Claudia*(1), Cocumelli Cristiano(1), Scholl Francesco(1), Di Francesco Cristina Esmeralda(2), Speranza Roberto(2), Pennelli Massimiliano(2), Di Guardo Giovanni°(2)

(1) Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, Roma. (2) Università di Teramo, Facoltà di Medicina Veterinaria

Nel novembre 2009, un giovane esemplare maschio di *Stenella coeruleoalba*, rinvenuto spiaggiato nei pressi di Ostia (Roma) e deceduto poco dopo, è stato sottoposto a necropsia presso la sede centrale di Roma dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana. Macroscopicamente si evidenziava moderata congestione polmonare, degenerazione epatica ed enterite catarrale diffusa; nel lume intestinale erano presenti numerosi esemplari del cestode *Tetrabothrium forsteri*. Istologicamente nei polmoni si osservavano focolai di modica flogosi interstiziale non purulenta, mentre nel fegato era presente una moderata steatosi diffusa. In sede cerebrale era altresì apprezzabile un'encefalite multifocale non purulenta, localizzata in particolare nella sostanza grigia della corteccia cerebrale e caratterizzata da manicotti perivascolari linfo-istiocitari, degenerazione neuronale, gliosi, neuronofagia e presenza di elementi sinciziali. Le indagini immunostochimiche per la ricerca di *Morbillivirus*, hanno dimostrato positività esclusivamente a livello encefalico, con abbondante presenza di antigene nei neuroni corticali e, in minor misura, negli astrociti. Tale risultato è stato confermato anche tramite la metodica RT-PCR, che ha consentito di rilevare la presenza di genoma virale solo in ambito cerebrale e non a livello polmonare, epatico, renale ed intestinale. Negativi sono risultati, infine, gli esami sierologici per la ricerca di anticorpi anti-*Brucella* spp. eseguiti a partire dal coagulo intracardiaco dell'animale. In conclusione, riteniamo di particolare interesse la presente segnalazione in quanto si tratta del secondo caso di encefalite morbillivirale in una stenella striata rinvenuta spiaggiata sulle coste italiane descritto da oltre 10 anni a questa parte rispetto ai casi riportati in precedenza. Un ulteriore motivo di interesse risiede nel "pattern" immunostochimico e biomolecolare osservato, con il riscontro di positività limitato alla sola compagine encefalica dell'animale.

Parole chiave: morbillivirus, stenella striata, encefalite.

MORBILLIVIRAL ENCEPHALITIS IN A STRIPED DOLPHIN (*Stenella coeruleoalba*) FOUND STRANDED ALONG THE LATIUM COAST OF ITALY

In November 2009, a juvenile male striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) found stranded on the Latium coast of Italy was submitted to Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana (Rome) for *post mortem* examination. Grossly, a moderate lung congestion associated with a mild liver degeneration and a diffuse catarrhal enteritis were observed. Many specimens of cestode *Tetrabothrium forsteri* were also detected in the intestinal lumen.

Histologically, a mild lymphoid interstitial pneumonia and a moderate, diffuse liver steatosis were observed. The main lesion was a non-suppurative encephalitis, characterized by mononuclear cell perivascular cuffings, neuronal degeneration, neuronophagia, microgliosis and presence of syncytial cells, with these findings mostly occurring in the grey matter of the cerebral cortex. Immunohistochemical evidence of morbilliviral antigen was found in neurons and, to a lesser extent, also in astrocytes, with no other tissues from this dolphin being positive. Similar results were obtained by means of RT-PCR technique, which yielded positive results on the brain tissue, but not on the lung, liver, kidney and intestine. Serological investigations against *Brucella* spp. were also negative. In conclusion, we believe this case is of interest since it represents the second description of a morbilliviral encephalitis in a striped dolphin found stranded on the Italian coastline, after over 10 years from previous reports of this lesion. Additional interest is provided by the peculiar immunohistochemical and biomolecular features, with "antigenic" and "genomic" positivity being exclusively confined to the brain of this dolphin.

Key words: morbillivirus, striped dolphin, encephalitis.

MARKERS TUMORALI PER CELLULE STAMINALI IN NEOPLASIE MAMMARIE FELINE: RISULTATI PRELIMINARI E ATTIVITA' DI SUPPORTO ALLA RICERCA

Ferrari Angelo¹, Campanella Chiara¹, Cimadomo Valeria¹, Migone Laura¹, Schiavetti Irene¹, Tiso Micaela¹, Florio Tullio², Barbieri Federica², Cardellino Umberto³, Petterino Claudio⁴, Turno Pasquale⁵, Ratto Alessandra¹.

¹ Centro di Referenza Nazionale per l'Oncologia Veterinaria e Comparata (CEROVEC), Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Genoa, Italia; ² Laboratorio di Farmacologia, Dipartimento di Oncologia, Biologia e Genetica, Università di Genova, Italia; ³ Dipartimento di Prevenzione ASL3 Genovese; ⁴ Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata ed Igiene Veterinaria, Padova; ⁵ Ministero della Salute - Direzione generale della sanità animale e del farmaco veterinario/Ufficio VI.

Le neoplasie mammarie occupano nel gatto il terzo posto per frequenza, dopo quelle ematopoietiche/linfoidi e cutanee evidenziando, come quelle umane, un alto grado di infiltrazione e dando sovente recidive e/o metastasi. Una nuova teoria del processo cancerogenetico indica le cellule staminali tumorali (CST), una piccola percentuale di cellule capaci di autorinnovarsi, come responsabili dello sviluppo e della progressione tumorale; queste sono state rilevate in diverse neoplasie umane, nel tumore mammario in particolare è stata identificata una sottopopolazione di cellule con fenotipo $ESA^+/CD44^+/CD24^{-/low}$ con proprietà "staminali". In questo studio abbiamo caratterizzato CST da carcinomi mammari felini. L'organizzazione della raccolta dei dati e della gestione del flusso dei campioni, che prevede il contatto diretto con i veterinari operanti sul territorio, ai quali vengono fornite le linee guida per il corretto campionamento del materiale biologico prelevato in corso di sedute di terapia chirurgica, è stata una parte importante per la buona riuscita del progetto di ricerca. I campioni sono stati sia dissociati per colture cellulari sia fissati in formalina per essere sottoposti a diagnostica istopatologica, con attribuzione del grading e colorazione immunohistochimica utilizzando diversi markers. I primi risultati ottenuti evidenziano la presenza di cellule $CD44^+$ su sezioni di carcinoma felino, confermando la presenza di possibili cellule staminali tumorali nell'ambito del tumore. Ciò è stato dimostrato anche da test di immunofluorescenza su cellule della stessa neoplasia in coltura.

Parole chiave: neoplasie mammarie feline, cellule staminali tumorali, oncologia comparata, CD44.

TUMOUR MARKERS FOR STEM CELLS IN FELINE MAMMARY CARCINOMA: PRELIMINARY RESULTS AND SUPPORT ACTIVITIES TO RESEARCH

Mammary tumors in cats represent the third most frequent, neoplasia after hematopoietic/lymphoid and skin tumors, showing, as in humans, high degree of infiltration and often giving relapse and/or metastasis. A new theory of cancerogenesis indicates the cancer stem cells (CSC), a small percentage of cells capable of self-renewal, as responsible for development and tumor progression, and these were detected in several human cancers. In breast cancer CSCs have been identified as a subpopulation of cells with phenotype $ESA^+/CD44^+/CD24^{-/low}$. Here we report the characterization of CSC from feline mammary carcinomas. The organization of data collection and management of the flow of samples that require a direct contact with veterinarians practitioner, which provides guidelines for proper sampling of the biological material collected during the surgery plays an important role for the success of this project. The samples were processed with techniques for cell cultures or fixed in formalin to be subjected to histopathological diagnosis, with grading and attribution of immunohistochemical staining with different markers. Preliminary results show the presence of $CD44^+$ cells on sections of feline cancer, confirming the presence of possible cancer stem cells within the tumor, that was also demonstrated by immunofluorescence test on cultured tumor cells from the same sample.

Key words: feline mammary tumor, cancer stem cells, comparative oncology, CD44.

DESCRIZIONE DI UN FOCOLAIO DI UNA PATOLOGIA NEUROLOGICA IN CAVALLI DA CORSA

Gibelli Lucia Rita, Salogni Cristian, Canelli Elena, Barbieri Ilaria, Catella Alessia, Gelmetti Daniela

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia Emilia Romagna - Brescia

Quindici cavalli da concorso appartenenti ad un centro ippico situato nella provincia di Brescia hanno manifestato una sintomatologia neurologica. Gli animali erano febbrili e atassici. I casi più gravi mostravano una progressiva paralisi dei quarti posteriori fino alla tetraplegia seguita, in 7 soggetti, da eutanasia e 3 di questi sono stati sottoposti ad approfondimenti diagnostici. Macroscopicamente era presente edema cerebrale; istologicamente una mieloencefalite linfocitaria associata a disturbi di circolo. Gli esami batteriologici erano negativi. Le indagini virologiche, biomolecolari e di immunistochemica hanno dimostrato la presenza dell'Herpesvirus equino tipo1(EHV-1) nel sistema nervoso centrale. L'immunopositività era focale e limitata al citoplasma delle cellule endoteliali. L'indagine genetica su un frammento ORF30 ha evidenziato una mutazione puntiforme già descritta per il genotipo neuropatogeno. Nonostante la vaccinazione nei confronti dell'EHV1 sia largamente utilizzata, la protezione nei confronti dei ceppi neuropatogeni virulenti non è assoluta. Infatti, come nel caso descritto, si può verificare che la circolazione di tali stipiti associata in alcuni soggetti, a cause predisponenti, evolva in una mieloencefalite irreversibile.

La molteplicità delle encefaliti infettive presenti in Europa, alcune delle quali a carattere zoonosico, impone di raggiungere una diagnosi eziologica attraverso indagini multidisciplinari, la maggior parte delle quali utilizza pannelli di anticorpi specifici. Tali reagenti sono indispensabili per identificare gli isolati e per valutare la distribuzione dell'antigene negli organi.

Parole chiave: neuropatologia, EHV-1, ORF30, immunistochemica, genotipo neuropatogeno.

A NEUROLOGICAL OUTBREAK IN THREE EQUINE STABLE

This work describes a neurological disease affecting 15 race horses recovered in a stable located in Lombardia a northern region of Italy. Fever, weakness, pelvic limbs paralysis and recumbency were the main signs. Seven tetraplegic animals were euthanized and 3 of them were submitted to laboratory for investigations. Cerebral oedema was the only gross lesion present; histologically a lymphocytic mieloencephalitis with vascular disorders was observed. Equine Herpesvirus-1 (EHV-1) was detected by real-time PCR, isolated from the nervous central system on RK13 cells and immunostained by using specific monoclonal antibodies. The genetic analysis of the partial ORF30 of the isolated strains revealed the presence of the genetic mutation on the polymerase gene previously described for the EHV-1 neuropathogenic genotype.

Although the use of an indirect prophylaxis, neuropathogenic EHV-1 cause encephalitis, our data confirmed that the ORF30 mutation is typical of neurotrophic strains. As infectious encephalitis could be a zoonotic pathology, morphological diagnosis could be completed by using specific tools such as specific monoclonal antibodies that appear to be the most suitable once.

Key words: neuropathology, EHV-1, neuropathogenic genotype, ORF30.

TUMORI EPITELIALI CORNEALI PRIMARI: OSSERVAZIONI PRELIMINARI

Giudice Chiara, Medardo Marta, Rondena Marco, Grieco Valeria

*DIPAV, Sezione di Anatomia Patologica e Patologia Aviare, Facoltà di Medicina Veterinaria,
Università degli Studi di Milano*

Papillomi e carcinomi squamosi (CS) corneali primari, senza coinvolgimento limbare, sono molti rari nel cane. Nel presente studio 9 casi di papilloma e CS corneali nella specie canina sono caratterizzati istologicamente ed immunoistochimicamente. MM: 4 papillomi e 5 CS provenienti da 8 cani sono stati ottenuti dall'archivio (1994-2010). Sezioni microtomiche sono state colorate con ematossilina-eosina ed immunocolorate (metodo ABC) con anticorpi anti Ki67 (MIB1) e p53 (CM1). È stato calcolata la percentuale di nuclei positivi per Ki67 (Indice proliferativo, IP) e per p53. L'indice mitotico (IM) è stato valutato come numero di mitosi/10 campi a 400x. **RISULTATI:** 5 CS derivavano da 5 cani, di età tra 7 e 14 anni; 2/5 affetti da cheratocongiuntivite secca (KCS) trattata con ciclosporina A (CsA); IM variava da 0.1 a 3.8; IP (Ki67) 34 - 50% e p53 15 - 68 %. Quattro papillomi derivavano da 3 cani (1 era una recidiva), età 4-13 anni, 3/3 cani erano affetti da KCS. IM variava tra 0.3 e 0.8, IP (Ki67) 19 - 33%; p53 tra 24.3 e 49.4%. **DISCUSSIONE/CONCLUSIONI:** papillomi e CS primari corneali sono rari e più frequentemente riscontrabili in cani con KCS. La protratta irritazione determinata da KCS determina metaplasia squamosa dell'epitelio corneale e può predisporre alla trasformazione neoplastica. Alcuni lavori mostrano che anche CsA può essere correlata ad un'attività pro-cancerogena. Inoltre l'esposizione a radiazioni UV è considerata un importante fattore predisponente allo sviluppo di CS e papillomi corneali e UVB sono responsabili di mutazioni di p53. Nei casi da noi esaminati è stata riscontrata un'alta percentuale di cellule neoplastiche positive a p53. È comunque verosimile che numerosi cofattori siano implicati nella patogenesi di questi rari tumori corneali.

Parole chiave: papilloma, carcinoma, cornea, p53, Ki67.

PRIMARY CORNEAL EPITHELIAL TUMORS: A PILOT STUDY

Isolated corneal papilloma and squamous cell carcinomas (SCC) have been rarely reported in dogs. In the present study, 9 canine primary corneal papillomas and SCC are reviewed and immunohistochemically characterized. MM: 4 corneal papillomas and 5 SCC from 8 dogs were retrieved from the archives (1994-2010). Microtomic sections were stained with Hematoxylin and Eosin and immunostained (ABC method) with antibodies anti-Ki67 (MIB1) and p53 (CM1). The percentage of nuclei stained with Ki67 (proliferative index; PI) and with p53 was calculated. Number of mitosis on 10 HPF (400x) was also calculated (mitotic index, MI). **RESULTS:** 5 dogs, aged 7-14 years had invasive SCC, 2 dogs had a history of keratoconjunctivitis sicca (KCS) treated with cyclosporin A (CsA); MI was 0.1-3.8; PI (Ki67) 34 to 50% and p53 immunostained 15 to 68 % of cells. Four papillomas were observed in 3 dogs (1 recidivated), aged 4-13 years, all with a history of KCS. MI in papillomas varied from 0.3-0.8, PI (Ki67) 19 - 33%; p53 24.3 to 49.4%. **DISCUSSION and CONCLUSIONS:** isolated corneal papillomas and carcinomas are rare and mostly observed in dogs with KCS. Sustained irritating stimuli in KCS initiates corneal epithelium metaplasia and could predispose to neoplastic transformation. CsA therapy has also been advocated as a cause of malignancies in humans. UV radiation have also been implicated as main carcinogenic factor for corneal SCC and papillomas, and UVB can cause p53 mutation. High percentage of neoplastic cells in our cases immunostained with p53. Most likely several co-factors interact in the pathogenesis of corneal SCC and papillomas.

Key words: papilloma, carcinoma, cornea, p53, Ki67.

UN CASO DI MUCORMICOSI IN UNA TIGRE

Grieco Valeria, Rondena Marco, Vallone Lisa*, Villa William**, Giudice Chiara

*Dipartimento di Patologia Animale. Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria – Sezione di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviaria, * Dipartimento di Scienze e Tecnologie Veterinarie per la Sicurezza Alimentare – Facoltà di Medicina Veterinaria – Università degli Studi di Milano.*

*** Libero professionista.*

Nell'arco di pochi giorni, tre tigri adulte di un circo sono morte con una sintomatologia simile e che comprendeva, come riferito dal clinico curante, depressione del sensorio, diarrea emorragica e scolo nasale sieroso-ematico. Poiché il circo si trovava assai lontano dalla nostra Facoltà, non è stato possibile effettuare l'autopsia di nessuna delle tigri e si sono potute esaminare soltanto porzioni di intestino, fegato, rene e milza provenienti da una di esse, una femmina di 5 anni. Pur essendo i campioni fissati in formalina, a livello dei tratti intestinali erano visibili lesioni tondeggianti, di colore bruno e d'aspetto necrotico-emorragico. All'esame istologico con Ematossilina-Eosina, le lesioni intestinali erano rappresentate da gravi trombosi, necrosi fibrinoide vascolare cui corrispondevano estese ulcerazioni della mucosa. Alla luce di ciò si sono ottenute altre sezioni istologiche in cui la colorazione con PAS metteva in evidenza la presenza di ife fungine morfologicamente riferibili a Mucoraceae all'interno di lumi vascolari. A questo punto, interrogandoci su quale potesse essere stata la fonte di infezione e trattandosi di animali strettamente carnivori, si è pensato alla segatura che generalmente viene usata per lettiera nelle gabbie dei grossi felini. Si è richiesto l'invio di un campione di tale segatura su cui è stato effettuato l'esame micologico che ha dato esito positivo permettendo l'isolamento di *Mucor hiemalis*. L'infezione da Mucoraceae è comune negli erbivori mentre nei carnivori è assai rara e talora associata a lesioni a livello cutaneo. Il presente caso dimostra che massicce contaminazioni da Mucoraceae possono indurre, nei felini, lesioni gravi anche in altra sede e suggerisce, in caso di gravi enteriti, di considerare la mucormicosi nella rosa delle diagnosi differenziali.

Parole chiave: tigre, *Mucoraceae*, micosi.

A CASE OF MUCORMYCOSIS IN A TIGER

Three adult tigers of a circus died in a few days with haemorrhagic diarrhoea and sero-haematic nasal discharge. Formalin fixed samples of spleen, intestine, liver and kidney of one of the tigers, a 5 year old female, were submitted from the practitioner for histological examination. Grossly, in the formalin fixed intestinal samples multifocal necrotic/haemorrhagic round lesions were visible. Histologically large ulcers were present in the intestinal mucosa associated with vascular thrombosis and fibrinoid necrosis of vessels in the underlying submucosa. PAS stain demonstrated fungal hyphae with rare septation (most likely Mucoraceae) in vascular lumina. As possible source of infection the sawdust, usually used as litter for large feline, was suspected and a sample was submitted to mycological exam that resulted positive isolating *Mucor hiemalis*. gastrointestinal Mucormycosis is common in ruminants whereas it is extremely rare in carnivores in which it has been occasionally associated with cutaneous lesions. The present case suggests that massive contamination with Mucoraceae can determine severe intestinal lesions also in feline species. - Intestinal Mucormycosis should be a differential diagnosis in the occurrence of severe enteritis in felines.

Key words: tiger, *Mucoraceae*, mycosis.

PIGOMELIA CON POLIDATTILIA IN UN PULCINO: ASPETTI RADIOGRAFICI ED ANATOMOPATOLOGICI

Lanteri Giovanni¹, De Majo Massimo¹, Caristina Giuseppa¹, Monea Claudio², Iannelli Nicola¹, Caprì Alessandra², Macrì Francesco¹.

¹ *Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Messina.* ² *Veterinario Libero Professionista.*

I difetti congeniti sono difetti strutturali o funzionali presenti alla nascita, si osservano durante la vita intrauterina o extrauterina e sono causati o favoriti da un'alterazione genetica o da un fattore nocivo per lo sviluppo embrio-fetale o dalla loro interazione; non si conoscono in toto i fattori eziologici. Il termine pigomelia indica l'inserzione di uno o più arti accessori nella regione pelvica; l'ectromelia è caratterizzata da una grave ipoplasia o aplasia di una o più ossa lunghe; la polidattilia anche conosciuta come iperdattilia, è un'anomalia congenita, nella quale i soggetti presentano uno o più dita rispetto alla normale conformazione. Scopo del presente lavoro è contribuire alla conoscenza delle malformazioni degli arti, descrivendo gli aspetti radiologici e anatomoistopatologici di un singolare caso di pigomelia, associata a polidattilia ed ectromelia dello zeugopodio, riscontrati in un pulcino. Macroscopicamente, si osserva un terzo arto accessorio, con un dito soprannumerario in prossimità delle pelvi; l'esame radiografico evidenzia l'origine di questo vicino all'articolazione coxo-femorale destra e l'ipoplasia della tibia. Non si evidenziano ulteriori singolarità. L'esame istologico con E.E. della tibia accessoria sottolinea la riduzione delle dimensioni della porzione distale; nello specifico, la cartilagine articolare non è visibile, a differenza di quella epifisaria che appare ipoplasica. Il tessuto spugnoso è totalmente assente, a differenza del tessuto compatto, addensato e disorganizzato, sotto al quale si riconosce un canale midollare scarsamente formato.

A causa delle scarse informazioni riguardanti l'anamnesi, non è stato possibile identificare l'eziologia delle anomalie da noi riscontrate. Le malformazioni singolarmente hanno scarsa incidenza nei volatili; tuttavia la contemporanea presenza di queste è un reperto finora mai descritto in letteratura.

Parole chiave: pigomelia, polidattilia, pulcino, radiologia, difetti congeniti.

PYGOMELIA AND POLYDACTYLY IN A CHICK: RADIOLOGICAL AND ANATOMO HISTOPATHOLOGICAL ASPECT

Congenital abnormalities are structural or functional defects present at birth. They are observed during the intrauterine or extrauterine life and are caused or facilitated by a genetic alteration or a factor harmful for the embryo-fetal development or their interactions; full etiologic factors are not known. The term "pygomelia" indicates the insertion of one or more accessory limbs in the pelvic region; "ectromelia" is characterized by severe hypoplasia or aplasia of one or more long bones; polydactyly also known as hyperdactyly is a congenital abnormality characterized by one or more supernumerary toes. The purpose of this paper is to contribute to the knowledge of limb malformations, describing gross anatomo histopathological and radiological aspects of a peculiar case of pigomelia associated with polydactyly and ectromelia of zeugopodium, seen in a chick. Macroscopically, there is a third accessory leg with a supernumerary finger near the pelvis; the X-ray shows the origin of this close to the articulation hip joint and right tibial hypoplasia. Histological examination with H&E ancillary tibia stresses the reduction in the size of the distal end; in particular, the articular cartilage is not visible, unlike the epiphyseal one that appears hypoplastic. The spongy tissue is completely absent, on the contrary the compact tissue appears, thickened and disorganized, around a narrow medullary canal. Because of limited information regarding the medical history, it was not possible to identify the etiology of the anomalies above reported. Individual malformations have little incidence in birds yet the contemporaneous presence of these to our knowledge has never been described in literature.

Key words: pygomelia, polydactyly, chick, radiology, congenital abnormalities.

PROVA SPERIMENTALE DI INDUZIONE DI MELANOSI IN SUINI NERI SICILIANI

Lanteri Giovanni, Marino Fabio, De Stefano Carmelo, Macrì Battesimo

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

Col termine melanosi si identifica una pigmentazione patologica congenita caratterizzata da anormale accumulo di pigmento grigio nerastro in organi e/o tessuti. Tuttavia, la possibilità di una pigmentazione acquisita correlata all'ingestione di ghiande è stata suggerita nel Suino Nero Siciliano. Una prova di induzione sperimentale di tale patologia è stata condotta su tali suini. Un totale di 12 soggetti, appartenenti ad un allevamento sito in provincia di Messina, dell'età di 7 mesi circa, con differente background genetico, è stato suddiviso in due gruppi; il primo alimentato con ghianda di quercia presente in loco, il secondo con mangime bilanciato commerciale. Dopo due mesi, i suini sono stati regolarmente macellati, e tutti gli organi e tessuti sono stati prelevati e campionati per le indagini anatomo isto-patologiche. Macroscopicamente, tutti i linfonodi prelevati dal primo gruppo presentavano una colorazione grigio nerastra diffusa sia alla corticale che alla midollare; tale pigmentazione non era presente nel secondo gruppo. L'esame istologico del tessuto linfonodale con Ematossilina Eosina identificava un infiltrato macrofagico veicolante pigmento nerastro. L'istochimica effettuata con Blue Nilo, Melanin Bleach e perossido di idrogeno, confermavano la natura del pigmento quale melanina. La positività immunoistochimica per macrophage marker, così pure l'esito negativo con S-100 e Anti Human Melanoma, escludevano definitivamente l'ipotesi di un possibile melanoma regressivo. Infine, la prova di Okun per la tirosinasi, effettuata su sezioni di intestino, confermava la presenza di attività enzimatica in molte cellule intestinali, identificate tramite Blu di Toluidina quali mastociti. I risultati ottenuti, ci hanno permesso di ipotizzare che l'enzima presente a livello intestinale nei suini, a contatto con le sostanze fenoliche contenute nella ghianda, possa andare ad attivare il primo step ossidativo di formazione della melanina, confermando l'ipotesi di una possibile melanosi indotta. Il presente lavoro rappresenta il primo report che dimostri la possibilità dell'esistenza di una melanosi acquisita.

Parole chiave: melanosi, suino nero siciliano, linfonodi, tirosinasi, ghianda.

EXPERIMENTAL CHALLENGE OF MELANOSIS INDUCTION IN NERO SICILIANO PIGS

Melanosis identifies a congenital pathological pigmentation characterized by anomalous storage of grey-black pigment in organs and/or tissues. Anyway the possibility of an acquired pigmentation related to acorn ingestion has been suggested in Nero Siciliano pig. A challenge to evoke experimentally melanosis has been performed using such pigs. 12 subjects, belonging to a private farm located in the Messina district, 7 months old, with different genetic background, were subdivided in two groups; first fed with acorns present in the area and second fed commercial balanced food. After two months, pigs were regularly slaughtered and all organs and tissues were collected and sampled for pathological investigations. At gross observation, all the animals fed on acorns showed black discoloration of almost all lymph nodes, in both cortex and medulla; such pigmentation did not appear in the second group. Histological sections of lymph node stained with Haematoxylin-Eosin identified a macrophage infiltration carrying the black pigment. Histochemical tests (Nile Blue, Melanin Beach and hydrogen peroxide) performed on tissues let us identify and differentiate the pigment as melanin. Immunohistochemical staining for macrophage markers, as well as the negative stain for S-100 and Anti Human Melanoma, let us to exclude definitely the hypothesis of a possible regressive melanoma. Finally, the Okun's method for tyrosinase, performed on intestine sections, confirmed the presence of the enzyme activity in many intestinal cells, identified by Toluidine bleu as mast cells. Our data, and the well known steps on melanin formation, confirm that swine enzyme present in the gut could act on phenolic substances found in acorns giving the first oxidative step of the melanin formation. This is the first experimental demonstration that acquired melanosis exists.

Key words: melanosis, nero siciliano pig, lymph nodes, tyrosinase, acorn.

ASPETTI ANATOMO ISTO-PATOLOGICI ED IMMUNOISTOCHEMICI DEL MELANOMA CUTANEO NEL SUINO NERO SICILIANO

Lanteri Giovanni¹, Marino Fabio¹, Ferrantelli Vincenzo², Mazzullo Giuseppe¹, Macrì
Battesimo¹

¹ *Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli
Studi di Messina*² *Istituto Zooprofilattico Sperimentale, Palermo, Sicilia*

Due esemplari di Suino Nero Siciliano regolarmente macellati, mostravano lesioni cutanee melanocitiche ed una colorazione nera a livello dei linfonodi lombari. I campioni prelevati sono stati processati per il criostato, istologia di routine e immunoistochimica. Macroscopicamente, il primo suino mostrava una ampia massa esofitica nera e sei piccole lesioni diffuse al dorso. Nel secondo soggetto, cinque differenti lesioni (macule e noduli) venivano identificate su tutto il corpo. I linfonodi lombari mostravano una diffusa colorazione nerastra della corticale e della midollare. Istologicamente, la massa esofitica presentava cellule altamente pigmentate da epitelioidi a fusate, accorpate in nidi di proliferazione; inoltre, diffuse cellule mono e multinucleate e granuli di pigmento melaninico libero invadevano il derma reticolare. Svariate figure mitotiche erano presenti nella componente dermica ed epidermica. Lesioni simili, ma invadenti il solo derma papillare, si evidenziavano nei piccoli noduli. Piccoli nidi di proliferazione con atipiche cellule macrofagiche rigonfiate, figure epitelioidi e/o dendritiche, si evidenziavano nelle macule. Soltanto nel secondo suino, ed in uno dei due noduli, il tumore era sovvertito da aree fibrotiche con abbondante infiltrato linfocitario, macrofagico e melaninico. L'esame istologico linfonodale evidenziava numerose cellule macrofagiche ripiene di granuli di pigmento nerastro. Melanin bleach e il perossido di idrogeno, decoloravano totalmente il pigmento entro le 24 ore. Infine, la positività immunoistochimica per macrophage marker, S-100 ed anti human melanoma, supportavano l'ipotesi di melanoma cutaneo.

Parole chiave: melanoma, suino nero siciliano, anti human melanoma, patologia, S-100.

ANATOMO HISTO-PATHOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL FINDINGS IN CUTANEOUS MELANOMA OF NERO SICILIANO PIG

Two Nero Siciliano pigs regularly slaughtered showed melanocytic lesions in the skin as well as black discoloration of only the lumbar lymph nodes. Tissue samples were processed for cryostate, routine histology and immunohistochemistry. In the first pig, a large exophytic dark mass and six small lesions were seen on the back. In the second pig, five different variously sized small maculae and nodules were seen on the back, as well as on the lateral part of the body. Lumbar lymph nodes showed a diffuse black color involving the cortex and sometimes the medulla. Histologically, in the large exophytic mass, highly pigmented epithelioid to plumped spindle cells arranged in nested proliferations, and a spreading of mononucleated and multinucleated cells, with numerous melanin granules which invaded the reticular dermis were observed; moreover mitotic figures could be observed in the epidermal and dermal component. Similar lesions, but invading the papillary dermis, were seen in the little nodules. In the macules, little nested proliferation and spreads of atypical highly pigmented melanocytes, with epithelioid or dendritic shape were seen. Only in the second pig, in one of the two small nodules, the tumor was replaced by foci of fibrosis with abundant infiltrate of lymphocytes, melanophages and free melanin pigment. Lymph node HE stained sections showed infiltration of macrophages carrying brown/black granular pigment. Melanin bleach and hydrogen peroxide, applied for 24 hours made the pigment totally disappeared. The immunohistochemical reaction showed positivity for macrophage marker, as well as for S-100 and anti human melanoma. The described findings supported the hypothesis that this is melanoma.

Key words: melanoma, nero siciliano pig, anti human melanoma, pathology, S-100.

LESIONI ANATOMO-ISTOPATOLOGICHE OSSERVATE IN CINGHIALI DEL “PARCO GRAN SASSO E MONTI DELLA LAGA” REGOLARMENTE MACELLATI

Marruchella Giuseppe¹, D’Ascanio Dino², Romanelli Dante¹, Di Nicola Umberto³

¹ Università degli Studi di Teramo, Dipartimento di Scienze Biomediche Compare, Piazza Aldo Moro 45, 64100, Teramo; ² Azienda Sanitaria Locale, Dipartimento di Prevenzione, Contrada Casalena, 64100, Teramo; ³ Ente Parco Nazionale Gran Sasso e Monti della Laga

La densità dei cinghiali nel Parco Nazionale “Gran Sasso e Monti della Laga” ha visto un netto incremento nel corso degli ultimi anni, con ricadute negative sugli ecosistemi e su alcune attività produttive. Ciò ha reso necessaria l’attuazione di un “piano di gestione” della specie, basato sulla cattura dei cinghiali all’interno di recinti mobili e sulla loro successiva macellazione.

In totale, sono stati oggetto di studio 101 cinghiali. Le lesioni osservate alla visita ispettiva *post-mortem* sono state sistematicamente riportate avvalendosi di una scheda semplificata. I rilievi macroscopici sono stati successivamente integrati dalle indagini istopatologiche.

La broncopneumonia parassitaria ha rappresentato il quadro lesivo di gran lunga più comune (92%). In sede epatica, è risultato piuttosto frequente il riscontro di lesioni epatiche riferibili alla migrazione di larve di ascaridi (28%), la presenza di noduli del Kisselev (19%) e di *Cysticercus tenuicollis* (15%). Cisti idatidiche da *Echinococcus granulosus* sono state osservate in 6 cinghiali, in sede epatica (6/6), polmonare (4/6) e splenica (1/6). Occasionale l’osservazione di ernie sottosierose del parenchima splenico (5%) e di cisti renali congenite (2%). Di interesse il comune riscontro di petecchie emorragiche renali (36%), verosimilmente riconducibili alla tecnica di macellazione, nonché la presenza di ulcere gastriche. Queste ultime sono state osservate esclusivamente nei cinghiali stabulati per alcuni giorni in stalle di sosta prima della macellazione.

La macellazione dei cinghiali ha rappresentato un’occasione straordinaria per valutare lo stato sanitario di una popolazione di animali selvatici residente in un territorio di elevatissimo interesse naturalistico. Oltre a fornire uno spaccato piuttosto esaustivo della situazione attuale, i risultati delle nostre indagini contribuiscono ad un’attenta valutazione del “benessere” degli animali nei diversi punti critici che si susseguono dalla cattura alle operazioni di macellazione.

Parole chiave: cinghiale, macellazione, stato sanitario, lesioni, benessere animale.

PATHOLOGICAL FINDINGS IN REGULARLY SLAUGHTERED WILD BOARS FROM “GRAN SASSO E MONTI DELLA LAGA” NATIONAL PARK

Wild boar population residing within the National Park “Gran Sasso e Monti della Laga” has been sharply increasing and negatively impacts on some ecosystems and human activities. Thus, a “management plan”, based on wild boars capture and slaughter, has been recently implemented.

In total, 101 wild boars were investigated. At slaughterhouse, pathological findings were systematically reported. Gross findings were then supplemented by histopathological investigations.

Parasitic bronchopneumonia was the most common lesion observed (92%). Hepatic “white spots”, Kisselev nodules (19%) and *Cysticercus tenuicollis* (15%) frequently occurred. *Echinococcus granulosus* hydatid cysts were detected in 6 wild boars, at hepatic (6/6), pulmonary (4/6) and splenic level (1/6). Occasionally, subserosal splenic hernias (5%) and congenital renal cysts (2%) were seen. Interestingly, renal petechiae, likely due to slaughtering procedures, were observed in a high percentage of animals (36%). Gastric ulcers were detected only in wild boars housed for several days before slaughter.

Wild boar slaughtering represents an extraordinary opportunity to assess their health status. Furthermore, our investigations contribute to a careful evaluation of animal “welfare” from capture to slaughter.

Key words: wild boar, slaughter, health status, pathological findings, animal welfare.

MIOCARDITE GRANULOMATOSA DA *Candida albicans* IN UN CANARINO (*Serinus canaria*)

Marruchella Giuseppe¹, Gianluca Todisco¹, Silvia D'Arezzo², Giovanni Di Guardo¹, Maria Grazia Paglia²

¹ *Università degli Studi di Teramo, Dipartimento di Scienze Biomediche Comparete, Piazza Aldo Moro 45, 64100, Teramo;* ² *Istituto Nazionale per le Malattie Infettive "Lazzaro Spallanzani", Laboratorio di Microbiologia Molecolare, Via Portuense 292, 00149, Roma*

Candida albicans è tra le principali cause di micosi. Le infezioni da *C. albicans* spesso conseguono a terapie antibiotiche prolungate, immunodepressione conseguente alla somministrazione di corticosteroidi, deficit nutrizionali o infezioni virali. Viene di seguito descritto un caso di miocardite granulomatosa ad esito fatale occorso in un canarino di razza Gloster Fancy di 20 gg di età.

Il soggetto mostrava grave deperimento ed è deceduto spontaneamente. In sede necroscopica si è osservata la presenza di un'unica lesione biancastra, di forma rotondeggiante (circa 2 mm di diametro), leggermente rilevata sulla superficie cardiaca. Il cuore è stato fissato in formalina neutra tamponata al 10% e processato, come di routine, per le successive indagini microscopiche (ematossilina-eosina, Gram, Ziehl-Neelsen, PAS, Grocott).

Istologicamente, la lesione coincideva con un classico granuloma, caratterizzato dalla presenza di un core necrotico circondato da cellule epitelioidi e da numerosissime cellule giganti multinucleate. La PAS-reazione e la colorazione di Grocott hanno evidenziato numerosi miceti e pseudoife nel contesto della lesione, morfologicamente compatibili con *Candida* spp. Le successive indagini biomolecolari hanno permesso l'identificazione definitiva di *C. albicans*.

Sulla base delle indagini morfologiche e biomolecolari, è stata dunque emessa la diagnosi di miocardite granulomatosa da *C. albicans*.

Le miocarditi fungine sono piuttosto rare negli uccelli e solitamente sono secondarie al coinvolgimento dei sacchi aerei. Tuttavia, nei soggetti immunocompromessi l'infezione può coinvolgere il cuore anche per via ematogena. Nel caso specifico, è probabile che la giovane età abbia rappresentato un fattore predisponente di cruciale importanza, sebbene non sia possibile escludere l'intervento di altre cause concomitanti.

Parole chiave: canarino, miocardite, granuloma, *Candida albicans*.

GRANULOMATOUS MYOCARDITIS BY *Candida albicans* IN A CANARY BIRD (*Serinus canaria*)

Candida albicans ranks among the major agents of mycoses. The present work reports a case of fatal granulomatous myocarditis by *C. albicans* in a 20-days-old canary bird (*Serinus canaria*) of the Gloster Fancy breed.

The animal under study showed a poor body condition, died spontaneously and was subsequently submitted to necropsy. A single, whitish, round-shaped lesion of 2 mm in diameter was observed protruding on the cardiac surface, this being the only appreciable finding on *post-mortem* gross examination. The entire heart was fixed in 10% neutral buffered formalin and embedded in paraffin. Tissue sections were subsequently stained with haematoxylin-eosin, Gram, Ziehl-Neelsen, PAS and Grocott techniques.

Microscopically, a typical granulomatous myocarditis was observed, characterized by a necrotic core that was surrounded by epithelioid macrophages and a large number of multinucleated giant cells. Grocott and PAS stains showed the presence of several yeasts and pseudohyphal elements. Biomolecular investigations definitively identified *C. albicans*.

Fungal myocarditis is infrequent in pet birds, this usually being the result of disease extension from air sacs. However, disseminated fungal infections can develop in immunocompromised hosts, resulting in hematogenous dissemination to the heart. The age likely played a crucial predisposing role in this bird; however, the concurrent role of additional intrinsic factors should be also kept in consideration.

Key words: canary bird, myocarditis, granuloma, *Candida albicans*.

PrP^{Sc} NELLE GHIANDOLE SURRENALI DI OVINI DI RAZZA SARDA INFETTATI SPERIMENTALMENTE CON L'AGENTE DELLA SCRAPIE

Marruchella Giuseppe¹, Sciota Domenico¹, Nonno Romolo², Di Bari Michele Angelo², D'Agostino Claudia², Vaccari Gabriele², Cosseddu Gian Mario², De Grossi Luigi³, Agrimi Umberto², Di Guardo Giovanni¹

¹ *Università degli Studi di Teramo, Dipartimento di Scienze Biomediche Compare, Piazza Aldo Moro 45, 64100, Teramo;* ² *Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Viale Regina Elena 299, 00161, Roma;* ³ *Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, Strada Terme, 01100, Viterbo*

La scrapie ovina è il prototipo delle encefalopatie spongiformi trasmissibili. Si ritiene che in condizioni naturali l'infezione si realizzi *per os* e che la successiva "neuroinvasione" avvenga per diffusione dei prioni lungo le fibre efferenti del sistema nervoso autonomo. La midollare del surrene si sviluppa dall'abbozzo ectodermico del simpatico ed è pertanto un "paraganglio simpatico". Scopo del presente lavoro è stato valutare il coinvolgimento del surrene in ovini di razza Sarda infettati sperimentalmente con l'agente della scrapie. Sono stati oggetto di indagine n°12 soggetti, infettati *per os* (n°10) o per via intracerebrale (i.c., n°2), sacrificati 16-28 mesi post-infezione (p.i.). L'accumulo di PrP^{Sc} è stato valutato mediante immunostochimica e *Western blot* (Wb). La presenza della PrP^{Sc} è stata dimostrata – mediante indagini immunostochimiche – a partire da 20 mesi p.i. ed ha interessato esclusivamente la midollare del surrene, risultando molto più abbondante negli ovini infettati *per os* ed affetti da scrapie clinicamente manifesta. D'interesse il deposito di PrP^{Sc} in corrispondenza di fasci di fibre nervose siti nello spessore della corticale del surrene. Il Wb ha evidenziato la presenza di PrP^{Sc} in tutti gli ovini oggetto di studio, a conferma della maggiore sensibilità del test. La midollare del surrene è parte integrante del simpatico, il quale partecipa attivamente alla diffusione del prione della scrapie, in senso centripeto e centrifugo. Ciononostante, i dati relativi al coinvolgimento delle ghiandole surrenali in corso di scrapie ovina sono piuttosto esigui. Le nostre indagini confermano che le surrenali sono sede di accumulo della PrP^{Sc}. Il loro coinvolgimento, piuttosto "tardivo" e successivo alla colonizzazione del sistema nervoso centrale da parte dell'agente della scrapie, avviene verosimilmente attraverso le fibre nervose del simpatico che originano dai neuroni dei nuclei intermedio-laterali del midollo spinale.

Parole chiave: ovino, scrapie, patogenesi, surrene.

PrP^{Sc} DEPOSITION IN ADRENAL GLANDS OF EXPERIMENTALLY SCRAPIE-INFECTED SARDA BREED SHEEP

Sheep scrapie is the prototype of transmissible spongiform encephalopathies. Scrapie infection naturally occurs *per os* and prions spread along sympathetic and parasympathetic nerve fibres. The present study aimed at investigating the involvement of adrenal glands – which are part of the sympathetic nervous system – in experimentally scrapie-infected Sarda breed sheep. Adrenal glands were collected from 12 animals infected either *per os* (10 sheep) or by the intracerebral route (2 sheep), and euthanized 16-28 months post-infection (p.i.). PrP^{Sc} deposition was evaluated by immunohistochemistry and Western blot (Wb) analysis. PrP^{Sc} deposition was immunohistochemically demonstrated since 20 months p.i. in adrenal medulla, being much more abundant in clinically scrapie-affected sheep. PrP^{Sc} was also detected within nerve fibres running throughout the adrenal cortex. Wb analysis showed PrP^{Sc} in all sheep under study. Although the adrenal medulla is part of the sympathetic nervous system, only few data are currently available about its involvement in sheep scrapie. Our study confirms that adrenal glands accumulate PrP^{Sc}, such event apparently occurring late and after CNS involvement. The scrapie agent likely colonizes adrenal glands by spreading along the sympathetic nerve fibres arising from the intermediolateral cell column of the spinal cord.

Key words: sheep, scrapie, pathogenesis, adrenal glands.

PILOMATRICOMA MALIGNO CON METASTASI OSSEA IN UN CANE

Martano Manuela*, **Navas Luigi*****, **Falletti Jessica*******, **Ilsami Raffaele****, **Meomartino Leonardo*******, **Maiolino Paola****

** Dipartimento di Patologia e Sanità animale- settore di Anatomia Patologica- Facoltà di Scienze Biotecnologiche; ** Dipartimento di Patologia e Sanità animale- settore di Anatomia Patologica, ***Dipartimento di Scienze Cliniche veterinarie ***** Centro Interdipartimentale di Radiologia Veterinaria - Facoltà di Medicina Veterinaria- ***** Dipartimento di Scienze Biomorfologiche e Funzionali - Facoltà di Medicina e Chirurgia- Università degli studi di Napoli Federico II*

Il pilomatricoma è una neoplasia cutanea che origina dalle cellule della matrice del pelo. Descritto esclusivamente nel cane e nell'uomo (Gould et al, 1983; Tateyama et al, 1991; Niedermeyer et al, 1995; Goldschmidt et al, 1981; Jackson et al, 2009) viene considerato, dalla maggior parte degli Autori, una neoplasia benigna che raramente dà luogo a recidive e /o a metastasi. Tuttavia, come nell'uomo, anche nel cane sono stati segnalati alcuni casi di pilomatricomi maligni con metastasi linfonodali e ad altri organi. Allo scopo di arricchire la casistica, abbiamo ritenuto opportuno segnalare un occasionale reperto di pilomatricoma maligno con metastasi ossea in un cane, meticcio, maschio di 11 anni. Il cane fu portato a visita a causa di una zoppia ricorrente all'arto anteriore sinistro e non risponsiva alla terapia farmacologica. L'esame radiografico mise in evidenza una lesione litica con aspetto "tarlato" e moderata proliferazione periostale a livello dell'epifisi distale dell'omero. Durante la visita clinica, fu evidenziata la presenza, a livello del collo, di una neoformazione del diametro di 1cm, di consistenza soda, fortemente adesa ai piani circostanti e sottostanti ed ulcerata. Al fine di effettuare un' esame istologico fu eseguito un prelievo bioptico su entrambe le lesioni. Istologicamente la neoformazione cutanea era caratterizzata da formazioni lobulari cistiche circondate da cellule basaloidei (cellule della matrice del pelo), con evidenti caratteri di malignità ed elevata attività mitotica e che, in alcuni tratti, protrudevano verso il lume a formare strutture simili a papille dermiche. Tra le papille, si riscontravano cellule pallide, debolmente eosinofile che lasciavano intravedere ancora l'ombra del nucleo (cellule ombra o fantasma). Tali cellule, andando progressivamente incontro a cheratinizzazione matricale, davano origine ad ammassi lamellari concentrici di cheratina. Il quadro istopatologico della lesione localizzata a livello dell'omero risultava del tutto sovrapponibile a quello della massa cutanea e ci permetteva quindi di formulare una diagnosi di pilomatricoma maligno con metastasi ossea. Il caso da noi descritto sembra confermare, la possibilità di una progressione maligna del pilomatricoma, come nell'uomo anche nel cane, e sottolinea quindi la necessità dell'asportazione chirurgica "radicale" ad ampi margini della neoplasia.

Parole chiave: pilomatricoma, cane, metastasi.

INTRODUZIONE

Il pilomatricoma è una neoplasia cutanea che origina dalle cellule della matrice del pelo. Descritto per la prima volta nel 1880 come epithelioma calcifico, con una origine dalle ghiandole sebacee, fu poi dimostrata la sua origine dalle cellule della matrice del pelo (Forbis and Hewig, 1961) e quindi proposto il nome corrente.

E' stato riscontrato esclusivamente nel cane e nell'uomo (Gould et al, 1983; Niedermeyer et al, 1995; Goldschmidt et al, 1981) e viene considerato dalla maggior parte degli Autori una neoplasia benigna, che da luogo raramente a recidive e con un basso potere metastatizzante. Tuttavia nell'uomo sono stati segnalati alcuni casi di pilomatricomi con metastasi linfonodali e ad altri organi. (Gould et al; 1984; Tateyama et al, 1991; Jackson et al, 2009) Nel cane, in letteratura, fino ad oggi, sono stati riportati pochi casi di pilomatricomi maligni (Carroll et al, 2010; Sells D.M., Conroy D.J, 1976; Goldschmidt MH, 1981; Johnson et al, 1983; van Ham L et al, 1991; Rodriguez F et al, 1995; Johnson M et al, 2000). Allo scopo di arricchire la casistica, abbiamo ritenuto opportuno segnalare un occasionale reperto di pilomatricoma maligno con metastasi ossea in un cane.

MATERIALI E METODI

Il cane, meticcio, maschio di 11 anni, venne portato a visita a causa di una zoppia ricorrente all'arto sinistro, che non rispondeva positivamente alla terapia farmacologica con farmaci anti-infiammatori non steroidei (NSAID). L'esame radiografico mise in evidenza una lesione litica con aspetto "tarlato" e moderata proliferazione periostale a livello dell'epifisi distale dell'omero, che venne sottoposto prima a biopsia per un esame istologico, poi ad amputazione. Durante la visita clinica, fu evidenziata la presenza, a livello del collo, di una neoformazione del diametro di 2cm, di consistenza soda, fortemente adesa ai piani sottostanti ed ulcerata (Fig.1). L'esame citologico dell'ago-aspirato diede una diagnosi di neoplasia di probabile origine dal follicolo pilifero. Dopo asportazione chirurgica, la massa fu fissata in formalina al 10%, inclusa in paraffina e colorata con ematossilina-eosina.

RISULTATI

Istologicamente la neoformazione cutanea era caratterizzata da formazioni lobulari cistiche (Fig.2), la cui parete è circondata da cheratinociti basaloidi, somiglianti a cellule della matrice del pelo in fase anagena. Tali cellule mostravano evidenti caratteri di malignità ed elevata attività mitotica e, in alcuni tratti, protrudevano verso il lume a formare strutture simili a papille dermiche. Nel versante interno delle cisti e tra le papille, si riscontravano cellule pallide, debolmente eosinofile che lasciavano intravedere ancora l'ombra del nucleo (cellule ombra o fantasma) (Fig.3). Tali cellule, andando progressivamente incontro a cheratinizzazione matricale, davano origine ad ammassi lamellari concentrici di cheratina. Erano presenti inoltre vaste aree di necrosi e di calcificazione. Il quadro istopatologico della lesione localizzata a livello dell'omero risultava del tutto sovrapponibile a quello della massa cutanea (Fig.4). La proliferazione neoplastica, a differenza della massa cutanea, non presentava alcuna connessione con la cute ed in alcune aree infiltrava le lamelle ossee. Considerando entrambi i quadri istopatologici descritti, venne effettuata una diagnosi di pilomatricoma maligno con metastasi ossea.

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

Nel cane l'incidenza del pilomatricoma viene segnalata intorno al 3%, in animali intorno al sesto anno di vita, con una prevalenza per le razze che presentano un mantello a crescita continua, nelle quali viene richiesta una maggiore quantità di follicoli piliferi mitoticamente attivi (Kerry Blue, Poodle, Bedlington Terrier, Bichon Frise, Schnauzer) (Walder and Gross, 1992). Generalmente tale neoplasia appare come una massa unica, di consistenza soda, a volte ulcerata, ben delimitata dal tessuto circostante, in posizione intradermica e/o sottocutanea, localizzata sul collo e sulle estremità superiori prossimali (Meuten, 2002). Istologicamente è costituita da formazioni lobulari cistiche la cui parete è costituita da cellule basaloidi che, nel versante interno delle cisti, vanno incontro a cheratinizzazione matricale, formando le caratteristiche cellule ombra o fantasma, cellule prive di nucleo, scarsamente colorate, di cui è visibile soltanto la membrana citoplasmatica. Il quadro microscopico del pilomatricoma maligno o carcinoma pilomatricale appare simile a quello della forma benigna, essendo composto da lobuli cistici, circondati da cellule basaloidi, che però

mostrano evidenti atipie e numerose mitosi. Spesso le cellule neoplastiche invadono il tessuto sottocutaneo, con associata reazione desmoplastica. Alla periferia del tumore si possono rilevare invasioni neoplastiche dei linfatici.

Il caso da noi descritto istologicamente appare sovrapponibile a quelli già riportati in letteratura e conferma quindi la possibilità, come descritto nell'uomo, di una progressione maligna del pilomatrixoma anche nel cane, sottolineando altresì la necessità dell'asportazione chirurgica "radicale" ad ampi margini della neoplasia.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Carroll EE, Fossey SL, Mangus LM, Carsillo ME, Rush LJ, McLeod CG, Johnson TO. Malignant Pilomatrixoma in 3 Dogs Vet Pathol. 2010 May 13
- 2) Forbis R Jr., Heiwig EB. Pilomatrixoma (calcifying epithelioma). Arch Dermatol 1961;83:606-8
- 3) Johnson R, Johnson J, Groom SC, Burgess L. Malignant pilomatrixoma in an Old English Sheepdog. Can Vet J.1983;24:392-394.
- 4) Johnson M, Thomas J, Barton C, Nasarre C, Lewis B. Popliteal lymph node aspirate from a dog with a maxillary mass. Vet Clin Pathol. 2000;29:13-15.
- 5) Goldschmidt MH, Thrall DE, Jeglum KA, Everett JI, Wood MG. Malignant pilomatrixoma in a dog. J Cutan Pathol. 1981;8:375-381.
- 6) Goldschmidt M.H., F.S. Shofer. Skin Tumors of the Dog and Cat. Pergamon Press, Oxford, 1992.
- 7) Gould E, Kurzon R, Kowalczyk A, Saldana AM; Pilomatrix carcinoma with pulmonary metastasis : Report of a case; Cancer 54:370-372, 1984.
- 8) Gross T.L., P.J. Ihrke, E.J. Walder. Veterinary Dermatology. A Macroscopic and Microscopic Evaluation of Canine and Feline Skin Disease. Mosby Year Book, St. Louis 1992
- 9) Malherbe A, Chenantais J. Note sur l'epitheliome calcifie des glandes sebacees. Prog Med (Paris) 1880;S:826-8.
- 10) Rodriguez F, Herraes P, Rodriguez E, Gomez-Villamandos JC, Espinosa de los Monteros A. Metastatic pilomatrixoma associated with neurological signs in adog. Vet Rec. 1995;137:247-248
- 11) Sells D.M., Conroy D.J. Malignant epithelial neoplasia with hair follicle differentiation in dogs. Malignant pilomatrixoma. Journal of Comparative Pathology 1976, 86; 121-129
- 12) Van Ham L, van Bree H, Maenhout T, et al. Metastatic pilomatrixoma presenting as paraplegia in a dog. J Small Anim Pract. 1991;32:27-30.



Fig. 1: Neoformazione cutanea localizzata sul collo, del diametro di circa 3 cm, ulcerata e fortemente adesa ai piani circostanti.

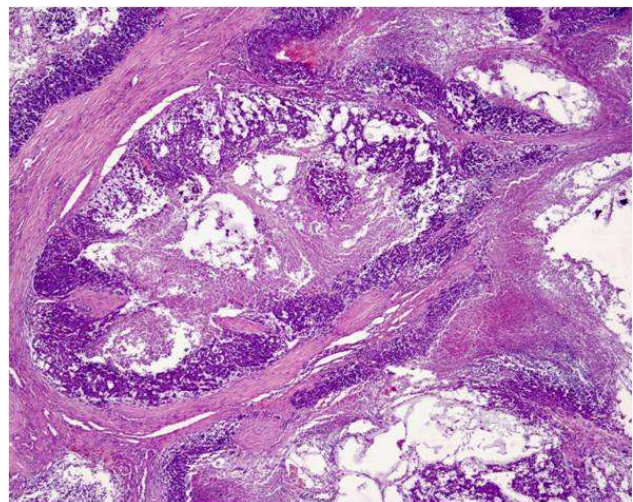


Fig. 2: Neoformazione cutanea localizzata sul collo: formazioni lobulari cistiche circondate da cellule basaloidi, con centri di cheratinizzazione matricale (Ematossilina – Eosina; 20X).

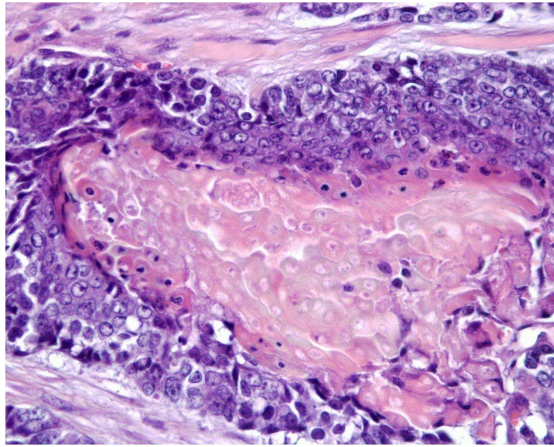


Fig. 3: Caratteristiche cellule ombra o fantasma localizzate nel versante interno delle cisti, che si presentano come cellule pallide, debolmente eosinofile che lasciavano intravedere ancora l'ombra del nucleo (Ematossilina – Eosina; 40X).

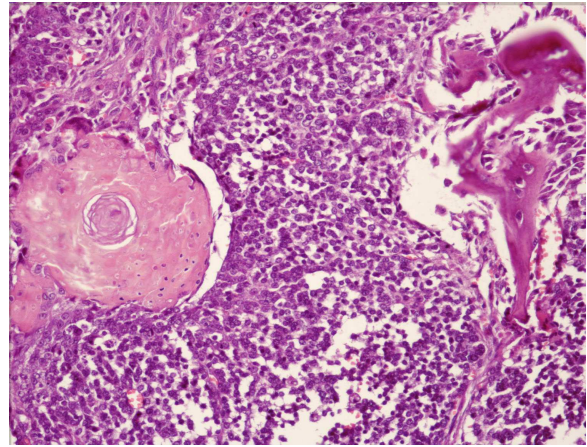


Fig. 4: Neoformazione ossea: cheratinociti basaloidi con evidenti caratteri di malignità, che invadono le lamelle ossee (Ematossilina – Eosina; 20X).

MALIGNANT PILOMATRIXOMA WITH BONE METASTASES IN A DOG

Pilomatrixoma is a benign tumor of hair matrix origin which was described almost exclusively in man and dogs. Whereas benign Pilomatrixoma is relatively frequent adnexal tumor, the incidence of their malignant counterpart is very low. However, several cases of pilomatrix carcinoma with local recurrence and metastases, have been reported in human and veterinary medicine. We report a case of pilomatrix carcinoma with bone metastasis in a mixed breed dog, male, aged eleven years. The dog was referred for a left forelimb lameness and an ulcerated mass on the neck. By RX a lesion of the cortical bone was showed on the left omerous. The mass on the neck was excised in toto and bone biopsy was performed. Microscopic examination of both specimens revealed cystic lobules composed of basaloid cells with abrupt transition to central keratotic material, with pycnotic and shadow cells. The final diagnosis was pilomatrix carcinoma with bone metastasis.

Key words: pilomatrixoma, dog, metastasis.

UN CASO DI NEUROFIBROMA DIFFUSO NELLE CAVITÀ NASALI DI UN CANE

Perillo Laura, Sfacteria Alessandra, Rapisarda Giuseppe, Mazzullo Giuseppe

Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria, Sezione di Patologia, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Messina, Polo Universitario dell'Annunziata, 98168 Messina

Con il termine tumori della guaina dei nervi periferici (PNST) vengono indicate le neoplasie come schwannoma (neurilemmoma) e neurofibroma. Quest'ultimo è un raro tumore costituito da cellule di Schwann, cellule perineurali, fibroblasti, mastociti degranulati, e può svilupparsi in forma localizzata, plessiforme o diffusa. Nel cane, i PNST in genere si sviluppano più frequentemente nel plesso brachiale, nella radice spinale e nei nervi cranici. Scopo del presente lavoro è descrivere un singolare caso di neurofibroma diffuso delle cavità nasali in un cane Pointer femmina di sei anni di età, in assenza di segni neurologici. Dopo il decesso il soggetto fu sottoposto a necropsia, che rivelava un'estesa e grave crescita neoplastica coinvolgente la cavità nasale sinistra e, in parte, il cavo orale. Allontanati i tessuti molli, la crescita coinvolgeva le strutture osteo-cartilaginee delle ossa nasali ed appariva di aspetto lardaceo. L'esame citologico evidenziava una scarsa popolazione di cellule fusate indicative di una generica neoplasia mesenchimale. Vari campioni tissutali venivano prelevati e fissati in formalina tamponata al 10% e routinariamente processati. Le sezioni istologiche venivano trattate secondo metodiche istochimiche (Ematossilina-Eosina, Blu di Toluidina, PAS, Van-Gieson, Luxol Fast Blue) ed immunoistochimiche (Tryptasi, Pecam, GFAP, S-100, Calretinina, PCNA, Vimentina). Istologicamente, il tessuto neoplastico appariva non capsulato e prevalentemente costituito da cellule mesenchimali allungate molto sottili, con citoplasma poco definito e debolmente eosinofilo, frammiste a corte cellule mesenchimali poco definite, numerose piccole fibre nervose, frequenti mastociti. Tutte le cellule apparivano immerse in abbondante matrice fibromixoide. L'immunoistochimica mostrava una forte positività delle cellule neoplastiche a GFAP, Vimentina ed S-100 ma negatività a Calretinina, supportando la diagnosi istologica di neurofibroma.

Parole chiave: PNST, neuro fibroma, cavità nasali, cane.

DIFFUSE NEUROFIBROMA IN THE NASAL CAVITY IN A DOG. A CASE REPORT

The term of peripheral nerve sheath tumour (PNST) has been used for neoplasms such as schwannoma and neurofibroma. In dog, these tumors develop most commonly in the brachial plexus, spinal root and cranial nerve. Neurofibroma is a rare tumour that arise from Schwann cells, fibroblasts, degranulated mast cells and perineural cells, it can be localized, plexiform or diffuse. Aim of this study is to describe a particular case of nasal diffuse neurofibroma in a six years old female Pointer dog without neurologic signs. Necropsy revealed an extended and severe neoplastic growth involving the left nasal cavity and, partially, the oral cavity. The neoplastic tissue appeared whitish and firm. Cytology revealed a generic spindle cell mesenchymal neoplasm. Tissue samples were formalin-fixed and paraffin-wax embedded. Sections were routinely prepared for histochemical staining and immunohistochemistry (Tryptase, Pecam, GFAP, S-100, Calretinin, PCNA, Vimentin). Histologically, the neoplastic tissue appeared not encapsulated and mainly constituted of elongated spindle cells admixed with more indeterminate short spindle cells, numerous small nerve fibers, frequent mast cells. Vimentin, GFAP and S-100 immunoreactivities were strongly evidenced in neoplastic cells, but no immunostaining was detected for calretinin, supporting the diagnosis of neurofibroma.

Key words: PNST, neurofibroma, nasal cavity, dog.

INDAGINE PRELIMINARE SULLA POSSIBILE PRESENZA DI SOSTANZA AMILOIDE (AA) IN PRODOTTI LATTIERO-CASEARI BOVINI

Pisani Laura Francesca^a, Rahman Mizan Md^a, Giorgetti Sofia^c, Zorzoli Irene^c, Gallanti Angelo^c, Bellotti Vittorio^c, Restelli Laura^a, Casula Antonio^a, Sartorelli Paola^{ab}, Ceciliani Fabrizio^{ab}

^a *Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Via Celoria 10, 20133 Milano, Italy.* ^b *CISMA Centro Interdipartimentale di Studi sulla Ghiandola Mammaria, Università degli Studi di Milano, Via Celoria 10, 20133 Milano, Italy.*

^c *Università di Pavia, Dipartimento di Biochimica, Viale Taramelli 3/B, 27100 Pavia, Italy*

Le amiloidosi sono un gruppo di patologie caratterizzate dalla presenza di depositi extracellulari di sostanza amiloide non solubile sottoforma di fibrille a struttura di β -sheet, positive alla colorazione Rosso Congo. Le amiloidosi sono patologie trasmissibili per diverse vie, inclusa la via orale, come dimostrato nei roditori. Il processo di trasmissione ricalca quello delle proteine prioniche, ed è pertanto ipotizzabile una trasmissibilità fra specie.

L'SAA è una proteina di fase acuta che aumenta la sua concentrazione nel siero e nel latte in corso di risposta sistemica all'infiammazione. In analogia con quanto è stato descritto per le patologie prioniche, la presenza di mastiti nella ghiandola mammaria aumenta la possibilità di trasmissione delle patologie conformazionali, creando un ambiente adatto alla destabilizzazione strutturale delle proteine con formazione di β -sheet. I processi di caseificazione possono inoltre favorire la precipitazione di fibrille. D'altra parte la presenza di proteasi del caglio e/o batteriche potrebbe essere sufficiente ad idrolizzare le fibrille e neutralizzarne l'attività patogena. Scopo di questo lavoro è valutare l'eventuale resistenza delle fibrille alla caseificazione. Il modello sperimentale prevede di simulare la formazione di sostanza amiloide nel latte aggiungendo fibrille bovine purificate da milza di animali con amiloidosi. Le fibrille sono state purificate mediante cicli di ultracentrifugazione e quantificate utilizzando un kit ELISA. L'effettiva presenza di SAA è stata verificata mediante western blotting. Fibrille di AA, in concentrazione equivalente a quella rilevata in corso di risposta sistemica all'infiammazione, sono state aggiunte al latte crudo utilizzato per la caseificazione.

In questa fase preliminare è stato messo a punto un protocollo di estrazione delle fibrille di AA da tessuto bovino ed è stata valutata la concentrazione di tali fibrille mediante ELISA comunemente utilizzato nel siero e nel latte. La fase successiva prevede l'estrazione e l'analisi delle proteine dal formaggio dopo una settimana di stagionatura al fine di determinare la persistenza delle fibrille.

Parole chiave: SAA, bovino, amiloidosi, formaggio.

INTRODUZIONE

Le amiloidosi sono un gruppo di patologie caratterizzate dalla presenza di depositi extracellulari di sostanza amiloide non solubile sottoforma di fibrille a struttura di β -sheet, positive alla colorazione Rosso Congo. Molti fattori come l'invecchiamento, mutazioni nella struttura proteica primaria e secondaria, fattori epigenetici compresa la composizione del cibo e le condizioni di allevamento possono influenzare la formazione di fibrille e il loro deposito nei tessuti (Jarrett JT et al. 1993; Rochet JC et al. 2000). È ormai comunemente accettata l'ipotesi che le proteine amiloidogeniche e le forme patologiche di proteine prioniche sono in grado di propagarsi inducendo cambiamenti conformazionali nelle proteine normali, perciò la trasmissione di fibrille di amiloide rappresenta un fattore epigenetico in grado di influenzare la formazione di nuove fibrille (Pan KM et al. 1993; Xing Y et al. 2002). Il processo di trasmissione dell'amiloidosi ricalca quello delle proteine prioniche, ed è pertanto ipotizzabile una trasmissibilità fra specie. Le amiloidosi sono patologie trasmissibili per diverse vie, inclusa la via orale, come dimostrato nei roditori (Koregana T et al. 2006; Zhang H et al. 2006).

La principale proteina fibrillare implicata nell'amiloidosi sistemica è una apolipoproteina, la Siero Amiloide A (SAA). L'SAA è una proteina di fase acuta in grado di formare amiloide in vivo e che aumenta la sua concentrazione nel siero e nel latte in corso di risposta sistemica all'infiammazione (Eckersall PD et al. 2006). In analogia con quanto è stato descritto per le patologie prioniche, la presenza di mastiti nella ghiandola mammaria aumenta la possibilità di trasmissione delle patologie conformazionali, creando un ambiente adatto alla destabilizzazione strutturale delle proteine con formazione di β -sheet. I processi di caseificazione possono inoltre favorire la precipitazione di fibrille. D'altra parte la presenza di proteasi del caglio e/o batteriche potrebbe essere sufficiente ad idrolizzare le fibrille e neutralizzarne l'attività patogena. Scopo di questo lavoro è valutare l'eventuale resistenza delle fibrille alla caseificazione. Il modello sperimentale prevede di simulare la formazione di sostanza amiloide nel latte sottoposto a caseificazione, aggiungendo fibrille bovine purificate da milza di animali con amiloidosi.

MATERIALI E METODI

Prelievo dei tessuti e colorazione Rosso Congo

In sede di macellazione sono state recuperate milze e reni bovini con amiloidosi e conservati a -80°C per il successivo utilizzo. Frammenti di tessuto sono stati tagliati al criostato in sezioni di $5\mu\text{m}$ che sono state idratate e colorate 10 minuti in Ematossilina, successivamente le sezioni sono state lavate in acqua distillata e colorate 1 ora con Rosso Congo.

Estrazione delle fibrille da milza bovina

Le fibrille sono state estratte da 14g di milza bovina applicando la procedura classica di estrazione acquosa (Pras M et al. 1968; Mangione P et al. 2001) in presenza di 1.5mM fenilmetilsulfonilfluoride (PMSF) dopo ripetute omogenizzazioni in tampone TE pH8 (10mM Tris/EDTA, 140mM NaCl, 0.1%NaN₃, 1.5mM PMSF) in ghiaccio. L'omogenato è stato suddiviso in provette da ultracentrifuga e sottoposte a 9 cicli di centrifugazione a 40000rpm a 4°C per 35 minuti. In seguito il pellet è stato risospeso in acqua distillata in presenza di 1.5mM PMSF e sottoposto a 9 cicli di ultracentrifugazione a 40000rpm a 4°C per 35 minuti. Le frazioni raccolte sono state liofilizzate. Parte del pellet delle centrifugazioni in TE e acqua sono state colorate con Rosso Congo.

Quantificazione delle fibrille

Le frazioni ottenute sono state risospese in 4ml di acqua distillata e la loro concentrazione è stata quantificata utilizzando il kit ELISA Phase Range Serum Amyloid A Assay (Tridelta Dev. Ltd, Ireland) comunemente utilizzato per la quantificazione di SAA nel siero. Ogni campione è stato diluito 1:5000 in buffer di diluizione 1X ad un volume finale di $50\mu\text{l}$ e piastrato con $50\mu\text{l}$ di anticorpo monoclonale biotinilato (1:100) per 1 ora a 37°C .

Al termine dell'incubazione la piastra è stata lavata con buffer di lavaggio, sono stati aggiunti $100\mu\text{l}$ di Streptavidina-Perossidasi (HRP) (1:4000) ed è stata mantenuta al buio a temperatura ambiente per 30 min. La piastra è stata lavata ed incubata con $100\mu\text{l}$ di TMB per 30 min a temperatura ambiente. Al termine dell'incubazione sono stati aggiunti $50\mu\text{l}$ di soluzione di stop e l'assorbanza è stata letta a lunghezza d'onda di 450nm.

SDS-Page, colorazione Commassie Brilliant Blue e Western blot

Le fibrille sono state separate in SDS-Page e trasferite su membrana di nitrocellulosa. La membrana è stata bloccata per 1 ora in PBS con 2% Albumina e incubata con un anticorpo biotinilato specifico per SAA (1:200) (Tridelta Dev. Ltd, Ireland) per 14 ore a 4°C . La membrana è stata incubata con Vectastain ABC Elite

standard kit (VectorLab, UK) per 5 minuti e lavata con PBS con 0.2% Tween.

È stata eseguita una SDS-Page e successivamente colorata per 20 minuti con Comassie Brilliant Blue.

Caseificazioni sperimentali

Il latte crudo (500ml) è stato portato a 35°C in agitazione, è stato aggiunto il caglio e lasciato riposare 1 ora. La cagliata è stata rotta e distribuita nelle formelle. Ad una delle cagliate sono state aggiunte le fibrille in concentrazione di 20µg/ml. Entrambi i formaggi sono stati lasciati stagionare a 4°C per 10 giorni. Al termine del periodo di stagionatura il formaggio è stato congelato per successive analisi.

RISULTATI

Prelievo dei tessuti e colorazione Rosso Congo

Le analisi istologiche preliminari dei tessuti prelevati al macello mostrano la presenza di amiloide depositata a livello degli endoteli dei vasi splenici (Fig.1a) e all'interno dei glomeruli renali (Fig.1b).

Colorazione Rosso Congo delle fibrille purificate

Per verificare la presenza di fibrille di amiloide aliquote di ogni frazione acquosa sono state colorate con Rosso Congo e, dopo osservazione a microscopio a luce polarizzata è stato possibile visualizzare le fibrille, in campo chiaro risulta evidente una colorazione arancione diffusa (Fig.2a), a luce polarizzata le fibrille sono evidenziabili con il caratteristico colore verde mela (Fig.2b).

SDS-Page, colorazione Comassie Brilliant Blue e Western blot

Dopo essere state risospese in acqua distillata, le frazioni acquose precedentemente liofilizzate sono state sottoposte ad elettroforesi SDS-Page e il gel è stato colorato con Comassie Brilliant Blue. La colorazione mostra come siano presenti aggregati di fibrille di diverso peso molecolare (Fig.3). Dal western blot è possibile verificare la presenza di fibrille di AA mediante l'uso di un anticorpo specifico per tale proteina. È stato quindi possibile confermare la presenza di aggregati di differente peso molecolare (Fig.4)

Caseificazioni sperimentali

Le caseificazioni ottenute a partire da 500ml di latte crudo hanno portato alla preparazione di due forme di formaggio. Come mostrato in figura 5 la forma a cui non erano state aggiunte fibrille era bianca (a) mentre la forma contenente fibrille di AA aveva una colorazione giallastra (b).

DISCUSSIONE

Tutte le attività diagnostiche e di ricerca riguardanti la patogenesi delle amiloidosi partono dalla caratterizzazione di fibrille isolate da tessuti di individui affetti. Per tale ragione il nostro lavoro ha dimostrato la possibilità di isolare fibrille amiloidogeniche da tessuto bovino, dopo comprovata amiloidosi mediante analisi istologica dei tessuti considerati, applicando il protocollo di purificazione acquosa messo a punto precedentemente nell'uomo e comunemente applicato per l'isolamento di fibrille da tessuto. Inoltre i nostri esperimenti hanno permesso di adattare un kit comunemente utilizzato nelle specie domestiche e zootecniche per la quantificazione di SAA nel siero e nel latte anche alle fibrille purificate, permettendo in tale modo di quantificare, dopo opportuna diluizione, la concentrazione di AA nelle frazioni raccolte.

Lo stesso anticorpo utilizzato in ELISA per il Western Blot ha permesso di confermare la presenza di AA nelle frazioni purificate ed accoppiata alla colorazione con Comassie ha mostrato l'aggregazione di tali fibrille che si distribuiscono a diversi pesi molecolari.

CONCLUSIONI

In questa fase preliminare è stato messo a punto un protocollo di estrazione delle fibrille di AA da tessuto bovino ed è stata valutata la concentrazione di tali fibrille mediante ELISA comunemente utilizzato nel siero e nel latte. La fase successiva prevede l'estrazione e l'analisi delle proteine dal formaggio dopo dieci giorni di stagionatura al fine di determinare la persistenza delle fibrille.

BIBLIOGRAFIA

- Eckersall PD, Young FJ, Nolan AM, Knight CH, McComb C, Waterston MM, Hogarth CJ, Scott EM, Fitzpatrick JL. *J Dairy Sci* (2006); 89:1488-1501.
- Jarrett JT, Lansbury PT. *Cell* (1993); 73:1055-1058.
- Korenaga T, Yan J, Sawashit J, Matsushita T, Naiki H, Hisokawa M, Mori M, Higuchi K, Fu X. *Am J Pathol* (2006); 168:898-906
- Mangione P, Sunde M, Giorgetti S, Stoppini M, Esposito G, Gianelli L, Obici L, Asti L, Andreola A, Viglino P, Merlini G, Bellotti V. *Protein Sci* (2001); 10:187-199
- Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D, Mehlhorn I, Huang Z,

Fletterick RJ, Cohen FE et al. *Proc Natl Acad Sci USA* (1993); 90:10962-10966
 Pras M, Schubert M, Zucker-Franklin D, Rimón A, Franklin EC. *J Clin Invest* (1968); 47:924-933
 Rochet JC, Lansbury PT. *Curr Opin Struct Biol* (2000); 10:60-68

Xing Y, Higuchi K. *Mech Ageing Dev* (2002); 123:1625-1636
 Zhang H, Sawashita J, Fu X, Korenaga T, Yan J, Mori M, Higuchi K. *Faseb J* (2006); 20:1012-1014

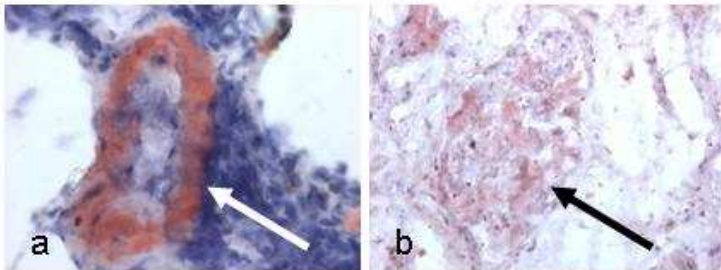


Fig. 1: sezioni di tessuto colorate con Rosso Congo che mostrano la presenza di amiloide depositata a livello degli endoteli dei vasi splenici (a) e all'interno dei glomeruli renali (b).

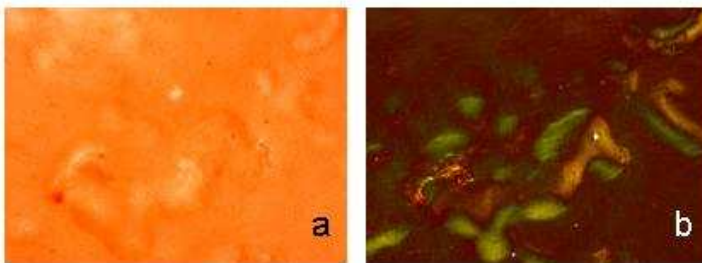


Fig. 2: foto al microscopio a luce polarizzata della frazione acquosa 3. In campo chiaro risulta evidente una colorazione arancione diffusa (a), a luce polarizzata le fibrille di amiloide assumono il caratteristico colore verde mela (b).

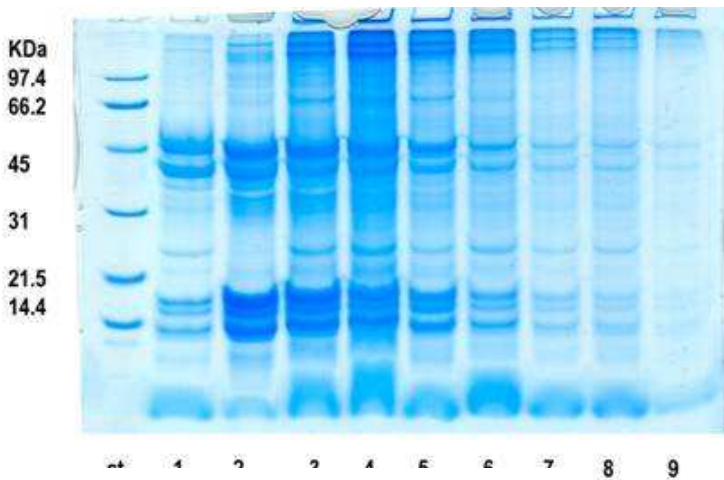


Fig. 3: elettroforesi SDS-Page e colorazione Comassie Brilliant Blue delle frazioni acquose estratte da milza bovina. È possibile visualizzare su gel la presenza di fibrille in aggregati di differente peso molecolare.

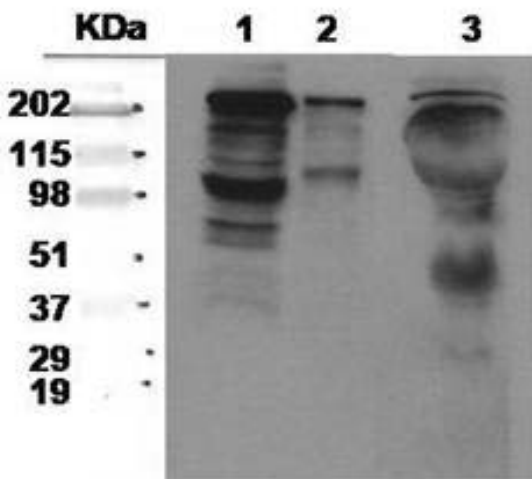


Fig. 4: western blot di fibrille delle frazioni acquose 3 (Line 1) e 4 (Line 2). Line 3 siero bovino come controllo positivo.

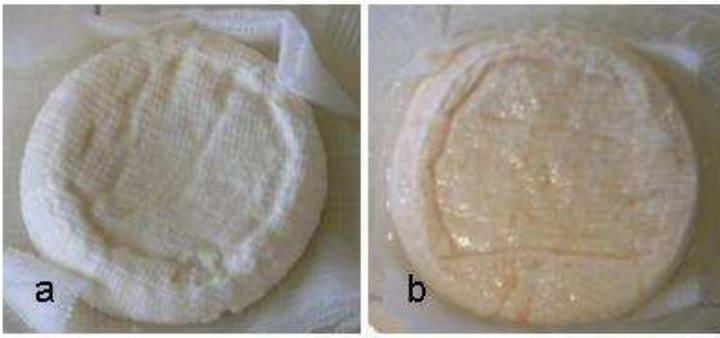


Fig. 5: caseificazioni sperimentali a partire da latte crudo. La forma senza aggiunta di fibrille appare bianca (a) mentre la forma contenente fibrille di AA assume una colorazione giallastra (b).

PRELIMINARY STUDY ON THE POSSIBLE PRESENCE OF AMYLOID (AA) IN DAIRY PRODUCTS

The demonstration of oral Amyloid-A (AA) fibril transmissibility has raised food safety questions about consumption of products from amyloidotic animals.

In a presumed prion-like mechanism, amyloid fibrils have been shown to trigger and accelerate the development of AA amyloidosis in rodent models. The finding of amyloid fibrils in edible mammalian food has led to concern that products of animal origin may activate a reactive systemic amyloidosis. Given the ability of amyloid fibrils to be transmitted into other species orally, we purified AA fibrils from bovine tissue and after quantification by ELISA assay; we performed western blotting to confirm the AA origins. Fibrils were then added to tank milk which was used for the preparation of cheese in order to evaluate the potential degradation of fibrils by proteases. In conclusion, in these preliminary experiments we established a protocol for extraction and quantification of fibrils purified from bovine tissues. The following steps will be the extraction and analysis of protein from cheese to determine the possible presence of fibrils.

Key words: SAA, bovine, amyloidosis, cheese.

DESCRIZIONE DI UN FOCOLAIO DI POLIARTRITE DA *Mycoplasma mycoides subs. capri/LC* IN CAPRE SICILIANE: ASPETTI ISTOPATOLOGICI ED IMMUNOISTOCHEMICI

Puleio Roberto, Agnello Stefano, Chetta Michele, Nicholas Robin¹, Loria Guido R.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, Palermo, Italy; ¹Mycoplasma Laboratory, Veterinary Laboratories Agency- Weybridge, UK

Gli autori descrivono un severo focolaio di mortalità in capretti (superiore al 40%), osservata in una azienda zootecnica di Sperlinga (Provincia di Enna), caratterizzata da poliartrite. La poliartrite coinvolgeva tutte le articolazioni degli arti anteriori e posteriori. Le articolazioni erano aumentate di volume, dolenti, ed erano evidenti difficoltà motorie e della postura. Le lesioni articolari erano caratterizzate da una artrosinovite con presenza di essudato sierofibrinoso e ispessimento della sinoviale. I linfonodi prescapolari, poplitei ed inguinali erano aumentati di volume, edematosi talvolta emorragici. Altre lesioni associate alla patologia articolare erano presenti in una piccola percentuale dei casi (10%): polmonite, pleurite, pericardite, epicardite, atrofia del timo, ed aspetto degenerato del parenchima renale. Le capre adulte non sembravano colpite ad eccezione di due soggetti con residuo interessamento dell'articolazione del carpo. Le lesioni istologiche interessavano i polmoni, il cuore, le articolazioni (in particolare i carpi) e i linfonodi tributari, in cui si evidenziavano congestione ed emorragie. I polmoni mostravano polmonite interstiziale con atelettasia ed enfisema, associata a trombosi. Il cuore, in alcuni soggetti, presentava una pericardite con infiltrazione di mononucleati. Le lesioni istologiche a carico delle articolazioni evidenziavano edema, iperplasia ed infiltrazione di macrofagi e linfociti della capsula sinoviale e dei tessuti periarticolari, con accumulo fibrina. I linfonodi tributari manifestavano una linfadenite reattiva iperplastica. Inoltre le indagini immunohistochemiche mostravano la presenza dell'antigene *Mycoplasma mycoides subs. capri/LC*, in particolare, nelle aree ove la reazione infiammatoria era maggiormente evidente, sia a carico dei polmoni che nelle articolazioni coinvolte. Gli autori sottolineano inoltre, l'interesse per gli aspetti di patologia comparata, di questo modello animale, per lo studio della patogenesi delle artriti immunomediate nell'uomo.

Parole chiave: *Mycoplasma mycoides subs. capri/LC*, poliartrite, capre.

INTRODUZIONE

Mycoplasma mycoides è alla ribalta delle cronache per essere il primo organismo “imitato” nella creazione della prima “cellula artificiale” con DNA e cromosomi “estranei”, in grado di riprodursi autonomamente in vitro (Gibson D.G. *et al.*, 2010). *M. mycoides subs. capri/LC*, segnalato occasionalmente in Sardegna, Puglia, Basilicata e Sicilia quale agente di agalassia contagiosa nelle greggi ovine (Montagna and Goffredo, 1989; Leori *et al.*, 1998) rappresenta oggi una preoccupazione emergente per gli allevatori per i gravi danni economici che arreca alla zootecnia ovis-caprina. Le lesioni esaminate in questo episodio di infezione, sono state osservate esclusivamente in capretti di 7-30 giorni di età in una azienda zootecnica ubicata nel comune di Sperlinga (Provincia di Enna). L'allevamento era costituito da circa 400 soggetti: un nucleo originario di capre di razza indigena a cui era stato aggiunto, da circa un anno, altri 50 esemplari selezionati di razza Camosciata delle Alpi provenienti dal Nord Italia. Nell'allevamento viene effettuata una stabulazione al pascolo con integrazione durante i periodi invernali e/o estivi.

DESCRIZIONE DEI CASI CLINICI

Il sintomo clinico più evidente era costituito da poliartrite estesa a tutti e quattro gli arti, particolarmente evidente sui carpi (fig. 1) e tarsi. In almeno il 70% dei capretti, di recente introduzione, le articolazioni erano aumentate di volume, dolenti, ed erano evidenti difficoltà motorie e della postura dolorabilità alla palpazione, letargia, frequenza respiratoria aumentata, disappetenza. Le capre adulte non sembravano colpite ad eccezione di due soggetti con residuo interessamento dell'articolazione del carpo.

MATERIALI E METODI

Da n. 10 soggetti si procedeva al prelievo del liquido articolare, di tamponi nasali e congiuntivali. Veniva prelevato il sangue ed il latte dalle 10 madri, apparentemente sane, dei capretti con sintomatologia. Quattro capretti deceduti nel corso della giornata venivano prelevati per successivi esami necroscopici.

Sul siero veniva effettuata la ricerca di anticorpi anti-*M. agalactiae*, con metodica ELISA per escludere una eventuale co-infezione (Check-kit *Agalactiae*, Pourquier, France). Liquido articolare, tamponi congiuntivali, tamponi nasali, e latte venivano messi in coltura entro le 24 ore dal

prelievo secondo procedure standard (Nicholas e Baker, 1998) a cui seguiva conferma eziologica tramite prove biochimiche (Holt 2000) e PCR (McAuliffe *et al.*, 2005).

Durante l'esame necroscopico si prelevavano porzioni di tessuto per l'esame istologico ed immunoistochimico, fissate in formalina tamponata al 10% e successivamente incluse in paraffina secondo le procedure convenzionali. Le sezioni ottenute al microtomo (di circa 4-5µ di spessore) venivano colorate con Ematossilina-Eosina, e con tecniche di immunoistochimica (LSAB kit Dako). L'anticorpo primario (AB policlonale di coniglio anti-*Mycoplasma myc. sub. myc. LC*) è stato fornito dal VLA di Weybridge, ove viene utilizzato per delle prove di laboratorio di inibizione della crescita dei Mycoplasmi; non conoscendo però la concentrazione dell'AB e la sua specificità è stata necessaria una fase preparatoria in cui, tale AB è stato utilizzato con un campione positivo noto. Per tale motivo è stata utilizzata una metodica già sperimentata da altri Autori (Recordati *et al.* 2008) che ha previsto la costruzione in Laboratorio di un controllo positivo (cosiddetto Sandwich).

RISULTATI

Gli esami di laboratorio hanno confermato la presenza di *M. mycoides subs. capri/LC* quale patogeno in causa. Dal liquido articolare è stato isolato un ceppo di micoplasma confermato con le prove biochimiche e con la PCR come *M. mycoides subsp. capri*. Tutti i tamponi nasali e congiuntivali sono risultati negativi. I ceppi isolati venivano inviati per ulteriore conferma al VLA di Weybridge (UK) che ne confermava l'eziologia. Al tavolo autoptico, dopo lo scuoiamento si poteva osservare che la poliartrite coinvolgeva indistintamente tutte le articolazioni degli arti anteriori e posteriori. Le lesioni articolari erano caratterizzate da una artrosinovite con presenza di essudato sierofibrinoso e ispessimento della sinoviale (fig.2). I linfonodi prescapolari (fig.3), poplitei ed inguinali erano aumentati di volume, edematosi talvolta emorragici. Uno solo capretto dei quattro presentava polmonite, pleurite, pericardite, epicardite, atrofia del timo, ed aspetto degenerato del parenchima renale (fig. 4-7).

Le lesioni istologiche interessavano le articolazioni i polmoni, il cuore, le articolazioni (in particolare i carpi) e i linfonodi tributari, in cui si evidenziavano congestione ed emorragie. I polmoni mostravano polmonite interstiziale con atelettasia ed enfisema, associata a trombosi (fig.8). Il cuore, in un soggetto, presentava una pericardite con infiltrazione di mononucleati. Le

lesioni istologiche a carico delle articolazioni evidenziavano edema, iperplasia ed infiltrazione di macrofagi e linfociti della capsula sinoviale e dei tessuti periarticolari, con accumulo fibrina all'interno del lume articolare che spesso riempiva completamente la cavità (fig.10). Non si osservavano erosioni della cartilagine articolare (poliartrite "non-erosiva"). I linfonodi tributari manifestavano una linfoadenite reattiva iperplastica (fig.12). Inoltre le indagini immunoistochimiche mostravano la presenza dell'antigene *Mycoplasma mycoides subs. capri/LC*, in particolare, nelle aree ove la reazione infiammatoria era maggiormente evidente, sia a carico dei polmoni che nelle articolazioni coinvolte (fig. 9, 11, 13).

DISCUSSIONE

L'aumentare della popolazione caprina in Sicilia, il recente miglioramento degli standard produttivi, l'attenzione verso prodotti caseari tradizionali, la presenza di una grande popolazione ovina, suscettibile all'infezione, non deve in questo delicato momento, essere messa a rischio da un'altra patologia insidiosa da micoplasmi che andrebbe ad aggiungersi ai danni causati dall'Agalassia contagiosa che ancor oggi è un problema irrisolto per gli allevatori. Inoltre la presenza di un quadro lesivo poliartritico così severo non sempre seguito dall'isolamento del patogeno, relativo a soggetti di pochi giorni o settimane di vita, lascia spazio a considerare alcuni potenziali aspetti comuni con patologia umane, con particolare riferimento allo studio della patogenesi delle artriti immunomediate (artrite reumatoide).

BIBLIOGRAFIA

1. Gibson, D. G., Glass, J. I., Lartigue, C., Noskov, V. N., Chuang, R. Y., Algire, M. A., Benders, G. A., Montague, M. G., Ma, L., Moodie, M. M., Merryman, C., Vashee, S., Krishnakumar, R., Assad-Garcia, N., Andrews-Pfannkoch, C., Denisova, E. A., Young, L., Qi, Z. Q., Segall-

Shapiro, T. H., Calvey, C. H., Parmar, P. P., Hutchison, C. A., 3rd, Smith, H. O., Venter, J. C. (2010) Creation of a Bacterial Cell Controlled by a Chemically Synthesized Genome. *Science*. 2010 May 20; IN PRESS

2. Montagna, C.O., Goffredo, G. (1989) L'Agalassia contagiosa degli ovini e dei caprini in Puglia e Basilicata. *Obiettivi Veterinari* 3, 17-20.

Leori, G., Tola, S., Carta, P., Rocca, S., Scianchi, G., Crobeddu, S., Rolesu (1998) Contagious agalactia in Sardinia. In: Frey J. and Sarris K. (Editors) *Mycoplasmas of ruminants: pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics*, Luxembourg: Office for official publication of the European Commission, pp 98-101.

3. Nicholas R.A.J. and Baker S.E.(1998). Recovery of mycoplasmas from animals. In :Miles R.J. and Nicholas R.A.J. Eds *Mycoplasma Protocols*. Humana Press, Totowa, New Jersey, pp.37-44

4. Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, R.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T. (2000) In W.R. Hensil (Editor) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th Edition. The Williams and Wilkins Company, Baltimore, Maryland, USA, pp 705-717

5. McAuliffe L, Ellis RJ, Lawes JR, Ayling RD, Nicholas RA. m16S rDNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis; a single generic test for detecting and differentiating *Mycoplasma* species.

J Med Microbiol. 2005 Aug;54(Pt 8):731-9.

6. Recordati C., Radaelli E., Simpson K.W., Scanziani E. 2008. A simple method for the production of bacterial controls for immunistochemistry and fluorescent in situ hybridization. *J. Mol. Hist.* 39:459-462.

7. R. Nicholas, R. Ayling, , L McAuliffe, 2008. *Mycoplasma Diseases of Ruminants: Disease, Diagnosis and Control*, Edited by Veterinary Laboratories Agency, Weybridge, Surrey, UK.

8. Edy M. V., Bozena M.K, Joachim F. (2006) *Mycoplasma mycoides subsp. capri* and *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides LC* can be grouped into a single subspecies. *Vet. Res.* 37 (2006) 779-790

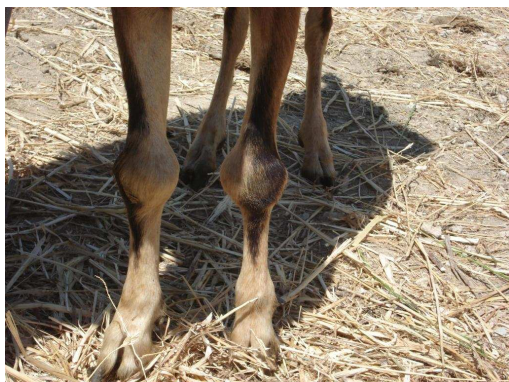


Fig. 1 Poliartrite, con particolare interessamento dei carpi.



Fig. 2 Artrosinovite carpica.



Fig. 3 Linfonodo pre-scapolare aumentato di volume.



Fig. 4 Lesioni polmonari.

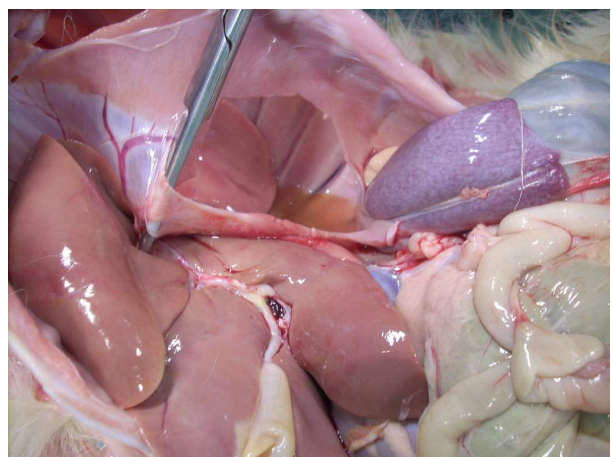


Fig. 5 Liquido pleurico.



Fig. 6 Aderenze pericardiche.

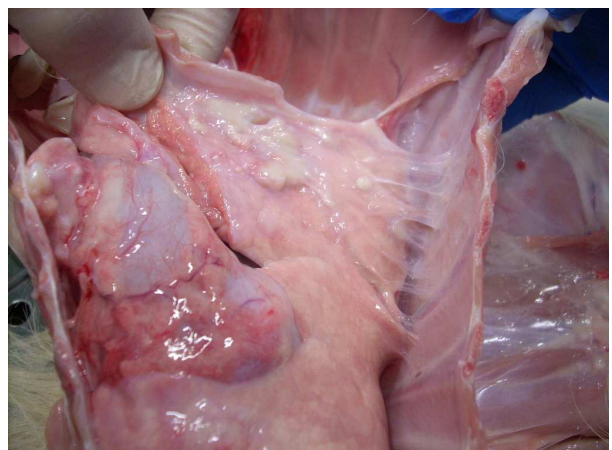


Fig. 7 Aderenze pleuriche.

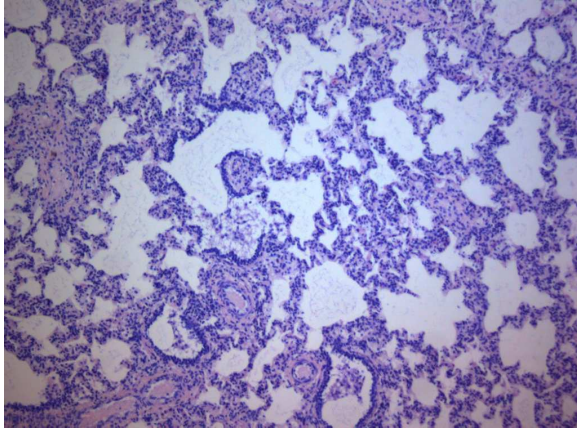


Fig. 8 E-E polmone 10X.

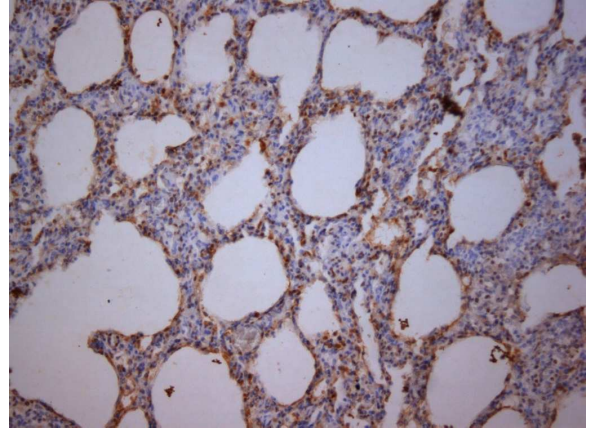


Fig. 9 IHC polmone 20X.

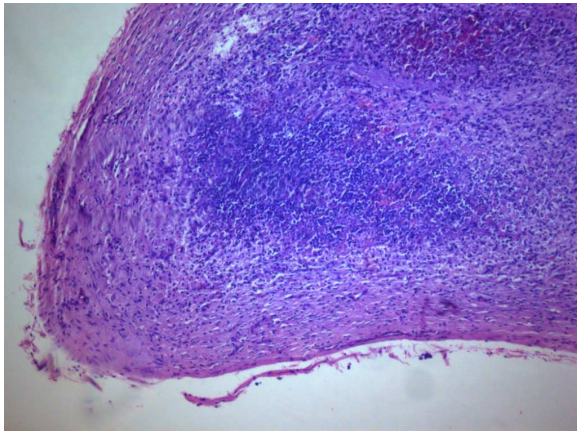


Fig. 10 E-E sinovia 10X.

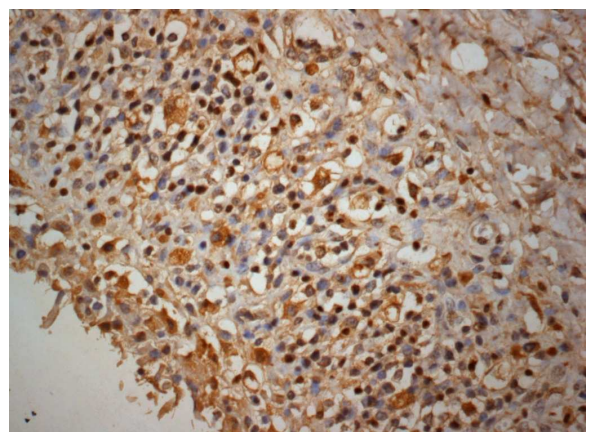


Fig. 11 IHC sinovia 20X.

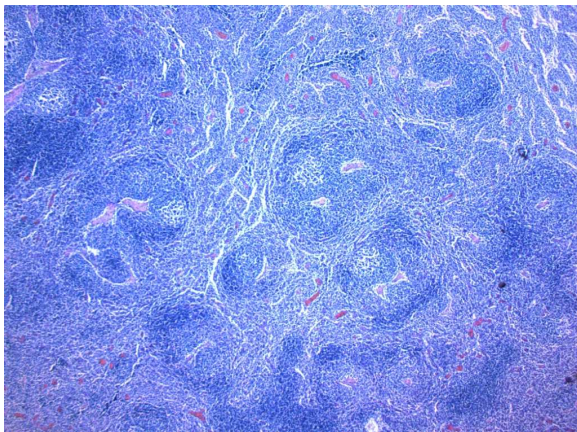


Fig. 12 E-E linfonodo 2,5X.

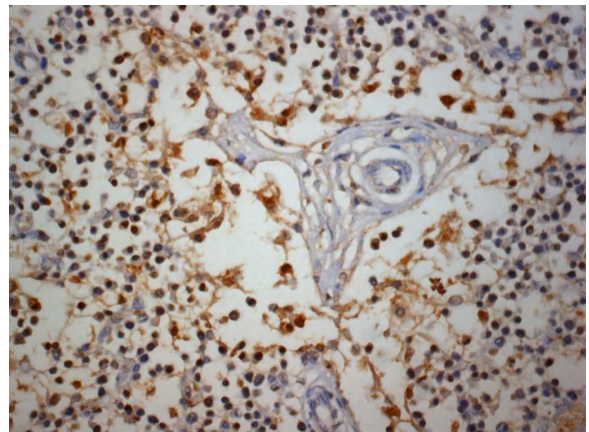


Fig. 13 IHC linfonodo 40X.

HISTOPATHOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL LESIONS INDUCED BY *Mycoplasma mycoides subs. capri/LC*

Authors report a severe outbreak of mortality in kids (above 40%) observed in a farm of Sperlinga village (Enna District-Sicily, Italy) characterised by diffuse non-erosive poly-arthritis in several (70%) goat kids. Other findings detected in smaller group (10%) of kids were: pneumonia, pleuritis, pericarditis,

epicarditis, atrophy of thymus, and “pulpy” appearance of the kidney. Immunohistochemistry detected *Mycoplasma mycoides subs. capri/LC* antigen in the cytoplasm of inflammatory cells of lungs and joints. Adult goats were apparently healthy with only two cases of residual chronic, carpal arthritis. Authors underline the relevance of this animal model for pathogenetic studies on human rheumatoid arthritis and similarity due to potential implications linked to “auto immune” response.

Key words: *Mycoplasma mycoides subs. capri/LC*, polyarthritis, goat.

DESCRIZIONE DI UN CASO DI MESOTELIOMA MALIGNO IN UN CANE

Puleio Roberto¹, Tamburello Anna¹, Schiavo Maria Rita¹, Garofalo Paolo³, Poli Alessandro², Loria Guido Ruggero¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia. ² Dipartimento di Patologia Animale Profilassi ed Igiene degli Alimenti - Università di Pisa. ³ Veterinario Libero Professionista

Il Mesotelioma è un tumore raro nel cane che può originare dalla sierosa pleurica, dai tessuti del mediastino e dalla sierosa peritoneale. In questo report si descrivono le caratteristiche anatomico-patologiche, citologiche, istopatologiche e immunoistochimiche di un mesotelioma maligno a carattere infiltrante in un cane con versamento pleurico. Un cane meticcio femmina di 12 anni veniva visitato dal veterinario curante a seguito di una anamnesi che riferiva difficoltà respiratoria. Il liquido toracico drenato veniva sottoposto ad esame citologico, con colorazione rapida (Diff Quick®), che metteva in evidenza alcuni gruppi di cellule polimorfe, ipercromatiche e con marcata basofilia citoplasmatica. Inoltre erano presenti numerose cellule infiammatorie e eritrociti. Le cellule manifestavano un aumentato rapporto nucleo-citoplasma, marcata anisocitosi ed anisocariosi, nuclei con dispersione cromatinica grossolana e con evidenti nucleoli di diverse dimensioni. La diagnosi presuntiva era di versamento pleurico causato da neoplasia maligna di probabile origine epiteliale. Successivamente veniva effettuata una toracosopia che metteva in evidenza numerose neoformazioni nodulariformi adese alla pleura, da cui si eseguivano prelievi biotici, fissati in formalina e successivamente inclusi in paraffina. I preparati istologici venivano quindi colorati con Ematossilina-Eosina per l'osservazione microscopica; inoltre per una migliore definizione della tipologia del tumore venivano eseguite ulteriori indagini immunoistochimiche per evidenziare l'espressione di Vimentina e Citocheratine, S-100 e Actina. L'Istologia metteva in evidenza, frammiste a fibre muscolari e abbondante stroma fibroconnettivale, gruppi di cellule epiteliodi, pleomorfe con bordi cellulari distinti, abbondante citoplasma leggermente eosinofilo e voluminosi nuclei posti centralmente con nucleoli evidenti. Le cellule neoplastiche mostravano marcata anisocitosi ed anisocariosi e qualche cellula multinucleata. Il numero delle mitosi era di 2-4 per campo (40X). L'Immunoistochimica per Citocheratine e Vimentina sono risultate entrambe positive, permettendo di diagnosticare la lesione come un Mesotelioma maligno. Il caso riveste particolare interesse in quanto relativo ad un cane che proveniva da un'area a rischio asbesto (Siracusa), in cui era presente una stabilimento Eternit (contrada Targia), per la lavorazione del cemento-amianto. E' infatti oggi riconosciuto il ruolo di "sentinella" che gli animali possono avere nei confronti dei fattori di rischio ambientale, sia per il ciclo biologico più breve, sia per la minore "dose" richiesta. Quindi lo studio comparativo sul comportamento dei tumori spontanei e sull'eventuale ruolo giocato da fattori di rischio ambientale nel determinismo dei tumori stessi, può fornire utili indicazioni per la prevenzione di neoplasie che colpiscono la specie umana.

Parole chiave: mesotelioma, asbesto, cane.

CASE REPORT: INVASIVE MESOTHELIOMA IN A DOG

This report describes gross, histological and immunohistochemical features of a invasive epithelial mesothelioma observed in a 12 year old female cross-bred dog. The tumor involved pleura, mediastinum and peritoneum and infiltrated submesothelial tissues. Neoplastic cells in the thoracic fluid showed prominent features of malignancy in a background of mixed inflammatory cells and scattered erythrocytes. Histologically, the tumor was characterized by nests of epithelioid cells with frequent mitotic figures and multinucleation that infiltrated submesothelial tissues. Neoplastic cells strongly co-expressed Vimentin and Cytokeratin intermediate filaments, which helped in the differentiation from other epithelial tumors of nonmesothelial origin.

Key words: mesothelioma, asbestos, dog.

CRIPTOCOCCOSI SISTEMICA IN UN GATTO IMMUNOCOMPETENTE

Richelmi Guia¹, Gorla Maria¹, Sant Serena¹, Varello Katia¹, Zoppi Simona¹, Romano Simona², Bozzetta Elena¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino, Italia

² Ambulatorio Veterinario Associato Dr. Centurelli – Dr.ssa Romano, Settimo Torinese (TO), Italia

Le infezioni fungine sistemiche sono infrequenti nel gatto, tuttavia negli ultimi anni la criptococcosi si è dimostrata una malattia emergente in questa specie. Questo studio descrive un caso di criptococcosi sistemica in un gatto europeo femmina di 5 anni. Il soggetto viveva abitualmente in casa, ma, prima di ammalarsi, aveva trascorso un mese presso un ambulatorio veterinario in stretto contatto con un gatto sano ospitato. Al momento della visita il gatto presentava una dermatite miliare diffusa, particolarmente evidente a livello di testa e tronco ed una grave astenia associata ad anemia emolitica, trombocitopenia e leucopenia, senza segni evidenti di interessamento delle vie respiratorie superiori. Il soggetto risultava sierologicamente negativo per FIV e FeLV. Il gatto è morto dopo una settimana con sintomi neurologici aspecifici. L' esame necroscopico ha evidenziato segni di consolidamento del parenchima polmonare e petecchie emorragiche, grave splenomegalia e presenza di formazioni miliari diffuse, degenerazione epatica e renale bilaterale. Sono stati prelevati SNC, cute, polmone, fegato, milza, intestino, pancreas reni e ghiandole surrenali da sottoporre ad esame istopatologico e micologico. L' esame istologico ha permesso di evidenziare a livello di tutti gli organi analizzati la presenza di numerose tipiche strutture a *bolla di sapone* riferibili a lieviti, circondate da un alone chiaro (sostanza capsulare non colorata). Si poteva inoltre osservare una moderata infiammazione granulomatosa. I preparati sono stati sottoposti alle colorazioni istochimiche PAS e Grocott, specifica per i funghi, entrambe risultate positive. L' isolamento dell' agente patogeno su terreno agar Sabouraud, e la sua identificazione per via genotipica con sistema Microseq® D2LSU rDNA Fungal kit (Applied Biosystem) hanno confermato la presenza di *Cryptococcus* spp. La tipizzazione molecolare, eseguita mediante analisi della sequenza nucleotidica del gene CAP59 secondo Nakamura et al. (2000), ha permesso di identificare il sierotipo A, ovvero *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*.

Parole chiave: gatto, criptococcosi sistemica, *Cryptococcus neoformans* var *grubii*, sequenza gene CAP59.

SYSTEMIC CRYPTOCOCCOSIS IN AN IMMUNOCOMPETENT CAT

Systemic fungal infections are uncommon in cat; nevertheless in the last few years cryptococcosis seems to be an emerging disease. This report describes a case of systemic cryptococcosis in a 5-year-old immunocompetent european female cat. This animal was referred for examination with several diffuse cutaneous granulomas, severe asthenia associated to hemolytic anemia, thrombocytopenia and leukopenia; no evidence of nasal discharge and/or swelling was noticed. The cat died one week later with neurologic symptoms. On necropsy widespread miliary dermatitis, pulmonary hemorrhagic petechiae, massive splenomegaly, hepatic and renal degeneration were observed. Samples from CNS, skin, lungs, liver, spleen, gut, pancreas, kidney, and adrenal glands were collected for histopathological and mycological examination. In all organs sampled histopathological examination showed a characteristic soap-bubble appearance with moderate infiltration of lymphocytes, plasma cells, and macrophages. Both PAS and Grocott stains were performed and resulted positive. Microbiological examinations led to isolate on Sabouraud's agar a strain identified first by mean of Microseq® D2LSU rDNA Fungal kit (Applied Biosystem). According to Nakamura et al.(2000), the isolate was then analysed for serotype by DNA sequencing of CAP59 gene, leading to identify it as *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotype A).

Key words: cat, systemic cryptococcosis, *Cryptococcus neoformans* var *grubii*, CAP59 gene sequence.

MIOPATIA IN UNA BOVINA: ASPETTI PATOLOGICI E CONSIDERAZIONI EZIOPATOGENETICHE

Sfacteria Alessandra¹, Lanteri Giovanni¹, Caccamo Gino², Mazzullo Giuseppe¹

¹ Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Messina. ² Veterinario Libero Professionista, Modica (RG), Specialista in “Fisiopatologia della Riproduzione degli Animali Domestici”

Vengono descritti i quadri patologici relativi ad una miopatia osservati in una vacca Frisona, di circa 6 anni, in lattazione, appartenente ad un allevamento sito nella periferia della città di Modica (Ragusa) e deceduta dopo 4 giorni di decubito.

Alla necropsia, l'esame macroscopico dei muscoli retti mediali, pettinei, deltoidi, sottospinosi e della parete addominale (obliquo interno, trasverso e obliquo esterno) rivelava quadri morfo-patologici sovrapponibili e caratterizzati da un aspetto pallido, di colore roseo-grigiastro, simili a “carne di pollo”, modicamente imbibiti e di consistenza lievemente diminuita, in netto contrasto con i restanti gruppi muscolari circostanti.

Tutte le sezioni istologiche di muscolo scheletrico esaminate presentavano quadri sovrapponibili e caratterizzati prevalentemente da edema interstiziale, estese aree di degenerazione miocellulare con fenomeni necrotici e di calcificazione, unitamente ad aree in preda a fibrosi associata ad infiltrazione di elementi mononucleati, rari polimorfonucleati tra cui qualche eosinofilo. Si osservava, inoltre, la progressiva sostituzione di tessuto muscolare con fibroblasti, fibre collagene e aree di raddomolisi. Di particolare rilievo era anche il riscontro di sarcocisti in diverse sezioni dei muscoli esaminati.

Tutti gli aspetti istopatologici osservati, unitamente alle caratteristiche macroscopiche dei muscoli colpiti, si dimostravano essere indicative di una miopatia che si presta, nel caso descritto, ad alcune speculazioni eziopatogenetiche.

Parole chiave: miopatia, vitamina E, selenio, *Sarcocystis*, bovino.

MYOPATHY IN A COW: PATHOLOGICAL FINDINGS AND ETIOPATHOGENETIC CONSIDERATIONS

Aim of the paper is to describe the pathological findings related to a myopathy observed in a 6 y.o. lactating Friesian cow, spontaneously dead after 4 days of decubitus.

Post-mortem examination revealed macroscopic changes of different muscle districts and histopathological findings referred to severe myopathy patterns with further features of sarcocystosis.

Data suggested to a myopathy whose different causes, in the present work, are taken into account.

Key words: myopathy, vitamin E, selenium, *Sarcocystis*, cow.

RISULTATI PRELIMINARI DI UNO STUDIO *IN VITRO* SULLA RISPOSTA DEI MACROFAGI BOVINI ALL'INFEZIONE CON *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

**Snel Gustavo¹, Capoferri Rossana², Marino Rosanna², Panelli Simona³, Strozzi Francesco³,
Piccinini Renata⁴, Williams John³**

¹ IDRA-LAB, Consorzio di Ricerca e Sperimentazione per gli Allevatori, Via Tomassetti, 9, 00161-Roma. ² IDRA-LAB, Istituto Sperimentale Italiano "L. Spallanzani", Via Einstein, 26900-Lodi. ³ IDRA-LAB, Parco Tecnologico Padano, Via Einstein, 26900-Lodi. ⁴ Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Università degli Studi di Milano, via Celoria 10, 20133-Milano

La paratubercolosi è una malattia causata da *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* (MAP), ed è di grande rilievo economico nell'allevamento delle bovine da latte. L'aumento dell'incidenza e le difficoltà nel controllo della malattia, hanno reso necessario l'approfondimento dello studio di nuove strategie volte alla prevenzione della malattia. Trattandosi di un patogeno intracellulare, i macrofagi sono profondamente coinvolti nella patogenesi dell'infezione, per cui la possibilità di evidenziare una loro maggiore o minore efficienza potrebbe rappresentare un punto chiave per l'identificazione degli animali resistenti. In questo studio preliminare abbiamo analizzato l'espressione genica di macrofagi bovini in coltura primaria, infettati con un ceppo di MAP isolato dalle feci di una vacca con sintomatologia clinica, utilizzando un rapporto MAP:macrofagi pari a 5:1 e 10:1. Dopo l'infezione, l'RNA cellulare è stato estratto e ibridizzato su un microarray sperimentale contenente 43,768 sonde per altrettanti geni (CombiMatrix). Sono state riscontrate differenze nell'espressione di 20 geni, con alterazioni di almeno 2 logaritmi ($P < 0.001$). Fra loro, le differenze più evidenti riguardavano i geni della metalloproteasi, dell'interleuchina 6, e dell'ossido nitrico sintasi. Questi risultati preliminari indicano l'interesse di tale modello *in vitro* nello studio dell'interazione fra MAP ed il sistema immunitario dell'ospite. Ulteriori ricerche sono in corso per confrontare animali con profili genetici diversi, usando questa metodica.

Parole chiave: *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*, macrofagi, espressione genica.

PRELIMINARY RESULTS OF AN *IN VITRO* STUDY OF BOVINE MACROPHAGES RESPONSE TO INFECTION WITH *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

Paratuberculosis is one of the most important diseases in dairy cattle. Increasing prevalence and difficulties in effective control concentrate efforts in developing new strategies for prevention. The selective breeding of resistant animals could be a promising strategy. Being *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* (MAP) an intracellular pathogen, macrophages are deeply involved in the pathogenesis of infection. For this reason, the demonstration of lower or higher effectiveness of macrophages could play a key role in the identification of resistant animals. In this preliminary study, we assessed the gene expression of bovine macrophages in 5-day cultures when infected with MAP at a ratio MAP/macrophage 5:1 and 10:1. After that, RNA was extracted from macrophages and hybridized to a custom microarray containing 43,768 unique gene probes (CombiMatrix). 20 genes were differentially expressed with a log fold change ≥ 2 ($P < 0.001$). Among those, we highlight the genes encoding Metalloproteinase, Interleukine 6 and Nitric Oxid synthase. Overall these data are good indicators of the reliability of the *in vitro* model to study the interaction between MAP and host immune defences. We are carrying out further studies based on this *in vitro* model, to compare animals with different genetic profiles.

Key words: *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*, macrophages, gene expression.

VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA DELL'ENZIMA 11 β -IDROSSISTEROIDE DEIDROGENASI 1 E 2 IN COLTURE DI ADIPOCITI BOVINI TRATTATI CON DESAMETASONE E PREDNISOLONE

Uslenghi Federica, Divari Sara, Cannizzo Francesca Tiziana, Demaria Raffaella, Pregel Paola, Biolatti Bartolomeo

Dipartimento di Patologia Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli studi di Torino

I corticosteroidi, in associazione o meno con altre sostanze ad azione anabolizzante, vengono illegalmente utilizzati come promotori di crescita negli allevamenti bovini. Primario obiettivo è quindi quello di individuare marker molecolari che evidenzino il trattamento illecito attraverso l'utilizzo di metodiche di indagine diagnostica specifiche e sensibili.

Gli effetti indotti dalla somministrazione di queste molecole che investono il metabolismo glucidico, proteico e lipidico, sono determinati dal legame delle molecole corticosteroidi con due tipi di recettore: il recettore dei glucocorticoidi (GR) e il recettore dei mineralcorticoidi (MR).

Uno step altrettanto importante nella regolazione dell'azione dei corticosteroidi risiede nel metabolismo pre-recettoriale di queste molecole, regolato dalle due isoforme dell'enzima 11 β -idrossisteroide deidrogenasi (11 β -HSDs).

Lo scopo di questo lavoro è stato quindi quello di valutare il profilo di espressione genica dell'enzima 11 β -HSDs e dei due recettori GR e MR in colture di adipociti bovini trattati separatamente con desametasone e prednisolone, corticosteroidi di sintesi principalmente somministrati a scopo terapeutico ma spesso utilizzati in modo fraudolento. La scelta della linea cellulare è stata dettata tenendo conto di un eventuale prelievo di tale tessuto, particolarmente abbondante, in sede di controlli.

In seguito al trattamento con desametasone e con prednisolone della durata di 48 ore abbiamo quindi notato una significativa up-regolazione dell'espressione genica degli enzimi 11 β -HSDs, espressione genica che, in seguito alla sospensione del trattamento di 24 ore, è nuovamente paragonabile a quella dei controlli.

MR non sembra essere espresso in questa linea cellulare mentre abbiamo evidenziato nell'espressione genica di GR una leggera down-regolazione solo nei campioni sottoposti a trattamento e sospensione.

Da questi risultati si può concludere che il sistema pre-recettoriale 11 β -HSDs viene regolato da glucocorticoidi di natura esogena e quindi potrebbe essere utilizzato come biomarcatore nel tessuto adiposo in vivo.

Parole chiave: glucocorticoidi, 11 β -idrossisteroide deidrogenasi, adipociti, bovini.

EVALUATION OF THE GENE EXPRESSION OF THE 11 β -HYDROXYSTEROID DEHYDROGENASES IN BOVINE ADIPOCYTE CELL CULTURES TREATED WITH DEXAMETHASONE AND PREDNISOLONE

Corticosteroids are used alone or in association with other anabolic molecules as grow promoters in cattle.

Glucocorticoid availability to bind and activate the glucocorticoid receptors (GR) or mineralcorticoid receptors (MR) is controlled by 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11 β -HSDs).

The aim of this work was to study the gene expression of 11 β -HSDs, GR and MR in bovine adipocyte cell cultures treated with dexamethasone and prednisolone separately.

A significant up-regulation of 11 β -HSDs gene following both treatment for 48 hours was detected. Twenty-four hours after treatment was discontinued gene expression was again comparable to that of controls. MR was not express while a light down-regulation of GR was detected and was still present after 24 hours discontinue. Results show that the 11 β -HSDs system is regulated by exogen glucocorticoids and could be regarded as a biomarker in the adipose tissue for glucocorticoid treatment also in live animals.

Key words: glucocorticoids, 11 β -hydroxysteroid dehydrogenases, adipocytes, cattle.

LOCALIZZAZIONE DI RECETTORI CD35 E CD16 IN CELLULE IMMUNOCOMPETENTI DI BRANZINO (*D. labrax*)

Volpatti Donatella, Bulfon Chiara, Pascotto Ernesto, Galeotti Marco

Dipartimento di Scienze Animali, Facoltà Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Udine.

Il fenomeno dell'opsonizzazione e il conseguente incremento dell'attività di fagocitosi da parte dei leucociti risultano determinanti nell'eliminazione dei patogeni dall'ospite. Le frazioni del complemento e gli anticorpi opsonizzanti sono molecole con un ruolo cruciale in tale processo, in associazione ai loro recettori: CR = recettore per il complemento; FcR = recettore per la porzione Fc delle immunoglobuline. Nei mammiferi CR1 (CD35) risulta espresso da eritrociti, granulociti neutrofili ed eosinofili, alcune sottopopolazioni di linfociti B e T, cellule dendritiche. Esso promuove il legame e la fagocitosi di particelle rivestite dalle frazioni complementari C3b e C4b. FcR γ III (CD16) risulta espresso da numerose cellule di origine emopoietica (macrofagi, linfociti T, granulociti, cellule natural killer) e il suo ruolo appare determinante nella modulazione della risposta immunitaria mediata da anticorpi (rimozione di immunocomplessi o di particelle opsonizzate). Lo scopo della presente indagine è stato quello di valutare la reattività di anticorpi commerciali per i recettori CD35 e CD16 di mammifero in vari tessuti di branzino (*Dicentrarchus labrax*). Con tale finalità, sezioni istologiche ottenute da tessuti prelevati da avannotti e giovanili (fissati in soluzione di Bouin) sono state sottoposte ad indagine immunostochimica utilizzando i seguenti anticorpi: anti CD35 (CR1) policlonale da capra e anti CD16 (FcR γ III) policlonale da coniglio (Santacruz Biotechnology, Inc). L'immunoreattività è stata evidenziata mediante ABCComplex perossidasi e substrato DAB. Cellule positive per l'anticorpo anti CD35 sono state evidenziate a livello dei seguenti organi: tratto digerente, timo, milza, rene, cute, branchie, pancreas e fegato. Cellule positive per l'anticorpo anti CD16 sono state evidenziate a livello di timo, milza, rene, branchie, tratto digerente. Morfologia e localizzazione delle cellule che esprimono i recettori oggetto di indagine vengono discusse, cercando di definire il loro potenziale ruolo nella risposta immunitaria in branzino.

Parole chiave: branzino, *Dicentrarchus labrax*, immuno-recettori, CD35 (CR1), CD16 (FcR γ III), immunostochimica, fagocitosi.

DEMONSTRATION OF CD35 AND CD16 RECEPTORS IN SEA BASS (*D. labrax*) IMMUNOCOMPETENT CELLS

The phenomenon of opsonisation and the consequent increase of phagocytosis by leukocytes are crucial to eliminate pathogens from the host. Fractions of complement and opsonising antibodies are molecules involved in this process, in association with their receptors: CR = complement receptor; FcR = receptor for the Fc fraction of immunoglobulins. In mammals, CR1 (CD35) is expressed by erythrocytes, neutrophils and eosinophils, some subsets of B and T lymphocytes, dendritic cells. It promotes the binding and phagocytosis of particles coated by C3b and C4b complement fractions. γ FCR III (CD16) is expressed by many hematopoietic cells (macrophages, T lymphocytes, granulocytes, natural killer cells) and its role is crucial in modulating the antibody mediated immune response (removal of immune complexes or particles opsonisation). The purpose of this investigation was to evaluate the reactivity of commercial antibodies developed to mammalian CD35 and CD16 receptors, in various tissues of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). With this purpose, histological sections obtained from tissues of fry and juveniles (fixed in Bouin solution) were investigated by immunohistochemistry using the following antibodies: goat polyclonal to CD35 (CR1) and rabbit polyclonal to CD16 (Santacruz Biotechnology, Inc.). The immuno-reactivity was detected by ABCComplex-peroxidase and DAB substrate. Cells positive for the CD35 antibody were detectable in the following organs: digestive tract, thymus, spleen, kidney, skin, gills, pancreas and liver. Cells positive for the CD16 antibody were detectable in thymus, spleen, kidney, gills, digestive tract. Morphology and localization of cells expressing the receptors under investigation are discussed, trying to define their potential role in the immune response of sea bass.

Key words: sea bass, *Dicentrarchus labrax*, immune receptors, CD35 (CR1), CD16 (FcR γ III), immunohistochemistry, phagocytosis.