

Associazione Italiana dei Patologi Veterinari  
APIV

Facoltà di Medicina Veterinaria  
Università di Padova

ATTI DEL XVI CONVEGNO APIV



Padova, 8-9 Maggio 1998

## ATTI MEETING APIV PRIMAVERILE 1998

PADOVA, 8-9 MAGGIO 1998

### ELENCO DELLE COMUNICAZIONI ORALI

LESIONI ARTROSICHE NEL CAVALLO: UNO STUDIO ARTROSCOPICO M. Dolera .....	9
CINETICA CELLULARE IN SEMINOMI DI EQUIDI G. De Vico, B. Restucci .....	15
EFFETTI DEL PENTOSAN POLIFOSFATO (PPS) SU COLTURE PRIMARIE DI CONDROCITI ARTICOLARI DI CAVALLO P. Borghetti, E. De Angelis, F.M. Martini .....	21
LA PATOLOGIA RENALE NEI CAVALLI MACELLATI L. Mandrioli, G. Bettini, P.S. Marcato .....	27
EPATOBLASTOMA IN UN PULEDRO C. Cantile, M. Arispici, F. Abramo, G. Incastrone, D. Pellegrini .....	31
SU UNA RARA MALFORMAZIONE INTESTINALE DEL CAVALLO P. Riccaboni, E. Scanziani, P. Mayer, S. Tassan .....	37
RIVELAZIONE IN SITU DI RNA DI SERV (SHEEP ENDOGENOUS RETROVIRUS) SU TESSUTI DI FETO OVINO: RISULTATI PRELIMINARI E. Sanna, M.P. Sanna, M. Palmarini, A. Leoni, A.M. Nieddu, M. Sharp .....	45
RUOLO DELL' IMMUNOISTOCHEMICA NELLA DIAGNOSI DELL' ENCEFALITE DA <i>Listeria monocytogenes</i> NEGLI OVI-CAPRINI E. Bozzetta, C Ligios, C. Casalone, E. Cotone, M. Liciardi, S. Lollai, M. Caramelli .....	51
EVIDENZIAMENTO DELLA PROTEINA PRIONICA NELLA SCRAPIE DELLE CAPRE N. Pozzato, M.T. Capucchio, V. Di Marco, F. Montesi, F. Guarda, B. Biolatti .....	63
FUNZIONALITA' GRANULOCITARIA NEL BOVINO: OSSERVAZIONI IN VITRO IN PRESENZA DI 2 DIVERSE CONCENTRAZIONI DI CORPI CHETONICI S. Comazzi, S. Paltrinieri, P. Sartorelli, F. Agnes .....	65
MASTITE DA <i>Mycoplasma agalactiae</i> : INDAGINI EZIOLOGICHE E QUADRO ISTOPATOLOGICO DELL' INFEZIONE. NOTA PRELIMINARE G.R. Loria, C. Sammartino, C. Piraino, R.A.J. Nicholas, S. Caracappa .....	71
CONTRIBUTO ALLO STUDIO DELLA ROTTURA DELLA PARETE ATRIALE CARDIACA NEL CANE F. Guarda, A. Giraldo .....	77
CARATTERIZZAZIONE DEL PROFILO ISTOLESIVO ED IMMUNOLOCALIZZAZIONE DELLA PrPsc IN CASI NATURALI DI SCRAPIE OVINA U. Agrimi, G. Di Guardo, C. Eleni, S. Marcon, M.A., C. Ligios, P. Fazzi, F. Cardone,	

M. Pocchiari .....	79
<p>CARATTERIZZAZIONE IMMUNOISTOCHEMICA DELLE POPOLAZIONI CELLULARI PRESENTI IN CORSO DI GASTRITE DA <i>Helicobacter pylori</i> NEL CANE</p>	
G. Rossi, D. Fortuna, P. Ghiara, G. Renzoni, G. Braca, E. Taccini .....	87
<p>OSTEOPATIA EREDITARIA NEL CUCCIOLO DI PASTORE MAREMMANO-ABBRUZZESE. NOTA PRELIMINARE</p>	
G. Mazzullo, B. Macrì, C. Stella .....	95
<p>ALTERAZIONI METABOLICHE IN ERITROCITI DI CANI ANEMICI</p>	
S. Paltrinieri, F. Agnes, S. Comazzi .....	101
<p>SARCOMA RETROPERITONEALE IN UN CANE</p>	
V. Grieco, G. Sironi, S. Romussi, S. Faverzani, M. Finazzi .....	107
<p>MALATTIA POLICISTICA EPATICA DEL CRICETO DORATO (<i>Mesocricetus auratus</i>)</p>	
F. Mutinelli, M.A. Bozza, F. Agnoletti .....	113
<p>CARCINOMA EPATOCELLULARE ASSOCIATO AD INFESTAZIONE DA CAPILLARIA NELLA TROTA IRIDEA (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)</p>	
P. Beraldo, M. Sarti, D. Volpatti, A. Frangipane di Regalbono, M. Galeotti .....	119

## LESIONI ARTROSICHE NEL CAVALLO: UNO STUDIO ARTROSCOPICO

Mario Dolera

*Medico Veterinario libero professionista*

*La Cittadina, Romanengo, CR*

### **Introduzione**

L'artropatia degenerativa, o artrosi, è nota come patologia articolare distruttiva, progressiva ed autopertuantesi (Bojrab, 1993). Essa può svilupparsi in articolazioni per altro normali, ed in tal caso viene definita primitiva, oppure costituire il quadro evolutivo finale di uno svariato numero di condizioni patologiche articolari rispetto alle quali risulta secondaria. Nella Medicina del Cavallo l'artrosi costituisce un capitolo di grande importanza (Cheli, 1986). Clinicamente si distinguono forme riguardanti diartrosi a movimento limitato (per esempio tarso-metatarsica ed intertarsica distale) e forme riguardanti diartrosi ad ampio movimento (la maggior parte delle articolazioni dello scheletro appendicolare) (Staschak, 1990). Un moderno approccio diagnostico all'artropatia degenerativa si avvale di indagini strumentali, quali la radiografia, l'ecografia, CT e RNM ove disponibili, l'artroscopia ed altre metodiche diagnostiche di pertinenza della patologia clinica e della cito-istopatologia (Auer, 1992; Butler et al., 1993). Ciascuna di queste metodiche presenta precise indicazioni, potenzialità e limitazioni. L'artroscopia costituisce uno tra i più potenti mezzi d'indagine sulle patologie articolari in generale, e sull'artrosi in particolare (Casscells, 1984; McIlwraith, 1990). Nel presente lavoro vengono descritte ed analizzate le lesioni artrosiche artroscopicamente evidenziabili nelle diartrosi a grande movimento dello scheletro appendicolare. La ricerca da cui è scaturito questo lavoro si è prefissata alcuni scopi, tra i quali: (1) una migliore definizione della gamma delle lesioni artroscopicamente evidenziabili che costituiscono manifestazioni dell'artrosi; (2) una più approfondita conoscenza delle espressioni artrosiche proprie delle singole articolazioni; (3) il tentativo di delineare le eventuali correlazioni tra quadri artroscopici ed equivalenti istologici di alcune lesioni; (4) una valutazione critica delle potenzialità diagnostiche dell'artroscopia.

## **Materiali e metodi**

Lo studio si riferisce ad esami artroscopici effettuati sia su soggetti condotti a visita clinica (9 casi) che su soggetti macellati per scopo alimentare umano (98 casi) presso tre macelli del Nord Italia (Voghera, Verdello e Travagliato). Sono state ricercate le lesioni che in letteratura umana e veterinaria sono considerate manifestazioni dell'artrosi (Casscells, 1984; Cheli, 1986; Guarda e Mandelli, 1989; McIlwraith, 1990). Tra le articolazioni esaminate, si sono rinvenute lesioni artrosiche in 48 articolazioni metacarpo-falangee, 56 metatarso-falangee, 16 carpiche, 12 omero-radio-ulnari, 12 gleno-omerali, 11 tibio-astragaliche, 10 femoro-tibio-rotulee, appartenenti a soggetti di età compresa tra 12 e 20 anni, di razze diverse, tra cui Quarter horse, Argentini, P.S. Arabo ed incroci da carne. In questi casi, l'esame artroscopico è stato effettuato subito dopo la macellazione. Sono state impiegate un'ottica artroscopica da 4 mm, una cannula d'inserzione da 4,6 mm, un otturatore smusso da 4 mm. Le immagini sono state filmate con videocamera CCD ½" e registrate mediante videoregistratore. Gli accessi artroscopici sono stati i seguenti: metacarpo- e metatarso-falangea, antero-laterale e postero-laterale; radio-carpica, anteriore; intercarpica, anteriore; omero-radio-ulnare, postero-laterale; gleno-omeroale, antero-laterale; tibio-tarsica, antero-mediale, femoro-patellare, antero-mediale; femoro-tibiale mediale, antero-mediale; femoro-tibiale laterale, antero-laterale (McIlwraith, 1990). Sono stati esaminati gli spazi articolari e le superfici condrali e sinoviali esplorabili artroscopicamente. Gli spazi articolari sono stati studiati in termini di forma, disposizione, ampiezza e contenuto. Le superfici condrali e sinoviali sono state studiate in termini di forma, profilo, colore, integrità, consistenza e dimensioni delle strutture annesse (villi, pliche sinoviali) (Casscells, 1984). Alcune lesioni sinoviali e condrali sono state oggetto di biopsia. I frammenti ottenuti sono stati fissati in paraformaldeide 4% per 24 h a 4 °C, indi disidratati ed inclusi in paraffina. Le sezioni ottenute, dello spessore di 6 µ, sono state colorate con Ematossilina Eosina, Tricromica Mallory, Azan e Kossa.

## **Risultati**

Nella Tabella allegata sono riportate le frequenze relative delle singole lesioni artrosiche osservate, in relazione alle diverse sedi articolari indagate.

**Localizzazione delle lesioni di più frequente riscontro nelle diverse sedi articolari.**

**Metatarso/metacarpo-falangea.** La degenerazione velvetică è stata osservata frequentemente sia nel comparto articolare anteriore che in quello posteriore, a carico dei condili, della cresta sagittale mediana e delle ossa sesamoidi. La condromalacia è stata osservata soprattutto relativamente alla cresta sagittale mediana. La malacia puntata è stata rinvenuta sulla superficie condrale delle ossa sesamoidi, come pure la condrocalinosi. La fibrillazione condrale è stata frequentemente osservata a carico della cresta sagittale mediana. Erosioni ed ulcere sono state notate molto frequentemente sui condili e, talvolta, sulle ossa sesamoidi. Osteofiti sono stati ritrovati applicati agli apici dei sesamoidi e lungo le creste laterali e mediali. Quadri di

LESIONI ARTROSCOPICAMENTE EVIDENZIATE														
			SUPERFICI CONDRALI							SUPERFICI SINOVIALI				SPA ZI ART ICO LAR I
ARTICOLAZIONI			Degen erazio ne velvet ica	Condr omala cia	Malac ia puntat a	Condr ocalci nosi	Fibrill azione	Erosio ne- ulcera	Osteo fiti	Distur bi di circol o	Calcin osi sinovi ale	Sinovi te cronic a	Corpi orizoi dei	Artrof ibrosi
SEDI	OSSE RVA TE	POSI TIVE	Frequenze delle lesioni nelle articolazioni positive											
Met. Fal.	120	104	.60	.28	.25	.19	.48	.86	.55	.60	.14	.96	.12	.34
Carpo	18	16	.25	.43	.37	.56	.31	.81	.31	.68	.18	.93	.12	0
Gomit o	13	12	.83	.16	.33	.33	.41	.33	.66	.41	.16	.83	.33	0
Spalla	12	12	0	.66	.75	.66	.91	.58	.25	.83	.16	.91	.25	.08
Tarso	13	11	.54	.63	.27	.18	.72	.90	.27	.81	.63	.90	.18	.18
Fem. Pat.	12	10	.40	.60	.40	.20	.40	.30	.90	.70	.20	.90	0	0
Fem. Tib.	12	10	.20	.70	.10	.80	.30 * .6	.20	.50	.60	.20	1	.4	0

\* fessurazioni meniscali

sinovite cronica proliferativa, associati talvolta a disturbi di circolo, sono stati osservati sia nel comparto anteriore che in quello posteriore (fondo cieco postero-prossimale). Nei casi particolarmente gravi lo spazio articolare risultava ridotto.

**Radio-carpica ed intercarpica.** Ulcere condrali sono state notate in vicinanza dei margini anteriori delle superfici articolari delle ossa carpiche e del radio, associate ad estesi fenomeni di condrocalinosi. Molto frequentemente sono stati osservati quadri

di sinovite cronica proliferativa, caratterizzati da ipertrofia e neoformazione di villi, spesso accompagnati da disturbi di circolo. Talvolta sono stati rinvenuti corpi risiformi. Spesso si sono osservati quadri di desmite posteriore. **Omero-radio-ulnare.** Frequenti fenomeni di degenerazione velvetica, associata a condrocalcinosi dei condili omerali. Sono stati rinvenuti osteofiti, talora voluminosi, applicati al becco dell'olecrano. La sinoviale del fondo cieco sovra-olecranico spesso mostrava quadri di sinovite cronica proliferativa, caratterizzati da neoformazioni tuberose. In alcuni casi sono stati rinvenuti voluminosi corpi orizoidei. **Gleno-omeroale.** Frequenti quadri di condrocalcinosi associata a fibrillazione diffusa della testa dell'omero. Spesso si sono osservate ampie ulcere a carico della porzione posteriore della testa dell'omero, circondate da cartilagine fortemente malacica. Sono stati osservati osteofiti lungo la glena scapolare. **Tibio-astragalica.** Tipicamente, si sono osservate erosioni ed ulcere sui labbri trocleari astragalici. Di norma la sinoviale anteriore mostrava ipertrofia dei villi e calcinosi. Sono stati osservati con una certa frequenza disturbi di circolo. **Femoro-patellare.** Si sono rinvenuti fenomeni di condromalacia e fibrillazione condrale sulla troclea femorale e sulla rotula, come pure osteofiti a placca lungo i versanti abassiali dei labbri trocleari. Frequente ipertrofia della sinoviale anteriore. **Femoro-tibiale mediale e laterale.** Osservati spesso quadri di condrocalcinosi dei condili femorali, associati a formazione di corpi orizoidei in relazione alle inserzioni dei legamenti del corno anteriore dei menischi. Sono stati osservati molto frequentemente fenomeni di fessurazione dei menischi, come pure la formazione di osteofiti a ridosso delle spine tibiali. Frequenti quadri di sinovite cronica proliferativa.

## **Discussione**

L'esame dei risultati ottenuti evidenzia come nella specie equina le lesioni artrosiche presenti in ciascuna articolazione possano essere numerose e complesse. Sembra di potere affermare che anche nel Cavallo si possano osservare artroscopicamente le lesioni che in altre specie, come l'Uomo ed il Cane (Casscells, 1984; Bojrab, 1993), sono considerate manifestazioni dell'artrosi. La frequenza delle singole lesioni osservate nelle diverse articolazioni nel corso dello studio è variabile, forse in relazione alle differenti sollecitazioni biomeccaniche: la fibrillazione condrale, per esempio, di rara osservazione nell'articolazione femoro-tibiale, è invece piuttosto frequente nella spalla. Ancora, la calcinosi sinoviale, così frequente

nell'articolazione tibio-tarsica, sembra più rara in altre sedi. Dato saliente è rappresentato da una certa correlazione fra tipo di lesione e localizzazione anatomica in una data articolazione: nel gomito, per esempio, gli osteofiti artroscopicamente evidenziabili si localizzano al becco dell'olecrano, nella metacarpo-falangea agli apici dei sesamoidi e lungo le creste laterali e mediali.

La sinovite proliferativa sembrerebbe costituire un elemento imprescindibile nel contesto dell'artrosi nel Cavallo. Elemento piuttosto interessante pare essere la correlazione tra lesioni sinoviali ed alcune lesioni condrali. Nelle articolazioni metatarso- e metacarpo-falangee si è osservata con elevatissima frequenza una contemporanea presenza di proliferazioni sinoviali ed erosioni-ulcere nel comparto articolare anteriore. Viste le reciproche disposizioni, si può supporre che le ulcere condrali osservate in questa sede costituiscano delle *kissing lesions*.

In generale, l'evidenza di una così grande varietà tra le lesioni condrali e sinoviali deve spingere ad interrogarsi sui percorsi patogenetici nei quali esse si collocano, sulla loro valenza clinica e sul loro valore prognostico.

La maggior parte delle lesioni osservate nel corso di questo studio difficilmente sarebbe stata svelata senza il ricorso all'esame artroscopico. Uno dei possibili sviluppi di questa ricerca potrebbe essere costituito da un confronto tra quadri artroscopici e quadri forniti da altre metodiche applicate alla diagnosi dell'artrosi nel Cavallo.

## **Bibliografia**

- 1) Auer J: *Equine Surgery*, Saunders, Philadelphia, 1992.
- 2) Boirab J: *Disease Mechanisms in Small Animal Surgery*. Lea & Febiger, Philadelphia, 1993.
- 3) Butler JA, Colles CM, Dyson SJ, Kold SE, Poulos PW: *Clinical Radiology of the Horse*, Blackwell Science, London, 1993.
- 4) Casscells SW: *Arthroscopy, Diagnostic and Surgical Practice*, Lea and Febiger, Philadelphia, 1984.
- 5) Cheli R: *Clinica Chirurgica Veterinaria*, UTET, Torino, 1986. Guarda F, Mandelli G: *Trattato di Anatomia Patologica Veterinaria*, UTET, Torino, 1989.
- 6) McIlwraith CW: *Diagnostic and Surgical Arthroscopy in the Horse*, 2<sup>nd</sup> edition, Lea and Febiger, Philadelphia, 1990. Staschak T S: *Adams' Lameness in Horse*, Lea and Febiger, Philadelphia, 1990.

## CINETICA CELLULARE IN SEMINOMI DI EQUIDI

G. De Vico e B. Restucci.

*Università degli Studi di Napoli "Federico II"*

*Dipartimento di Patologia e Sanità Animale. Settore Anatomia Patologica.*

### **Introduzione**

La determinazione dell'attività proliferativa, delle cellule neoplastiche valutata mediante i cosiddetti "indici di proliferazione cellulare" (Indice Mitotico, Ag-NOR, PCNA) fornisce spesso utili indicazioni sul comportamento biologico di un determinato tumore. In particolare, le cosiddette proteine Ag-NOR, sono un gruppo eterogeneo di proteine acide, non istoniche, strettamente associate al DNA (DNAr) che codifica per l'RNA ribosomiale (RNAr) (Fakan e Hernandez-Verdun, 1986). In sezioni di tessuto colorate con una specifica tecnica di impregnazione argentica (tecnica Ag-NOR) (Ploton et al., 1986), esse appaiono come punti neri di diverse dimensioni (Ag-NORs) spesso aggregati all'interno dei nucleoli (Ag-NOR Clusters) (Howat et al., 1988). Il numero, le dimensioni e la distribuzione di tali strutture nel nucleo delle cellule di una determinata popolazione neoplastica, variano proporzionalmente alla *velocità* di moltiplicazione cellulare (tasso di crescita) (Derenzini et al. 1990), e al *numero* di cellule proliferanti (frazione di crescita). Alla frazione di crescita di un tumore, è correlato anche il cosiddetto Indice Mitotico, rappresentato dalla percentuale di figure mitotiche su un numero determinato di elementi neoplastici (Quinn e Wright, 1990). Negli ultimi anni, l'uso di tali indici in oncologia veterinaria si è sempre più affermato, dimostrandosi un valido mezzo diagnostico e prognostico in numerosi tumori spontanei animali (De Vico, Maiolino, Galati, 1996).

In questo studio, ci è sembrato utile valutare il valore prognostico della quantificazione delle proteine Ag-NOR in alcuni seminomi di equidi, nonché le correlazioni esistenti, in questi tumori, tra quantità di proteine Ag-NOR ed Indice Mitotico (IM).

## **Materiali e Metodi**

Sono stati esaminati 10 seminomi di equidi, di cui uno metastatizzato in numerosi organi. Tutti i casi esaminati risultavano, secondo la classificazione istologica del WHO (Nielsen e Lein, 1974), di "tipo diffuso". Per ogni caso studiato, campioni di tessuto neoplastico fissati in formalina ed inclusi in paraffina sono stati sezionati a  $5\mu\text{m}$  e colorati con Ematossilina-Eosina e con la tecnica Ag-NOR mediante incubazione prolungata (De Vico et al. 1994). Lo studio morfometrico degli Ag-NOR Clusters è stato effettuato mediante sistema automatico di analisi di immagine: per ogni caso studiato, da sezioni di tessuto marcate con l'argento sono stati selezionati campi a più alta cellularità utilizzando un obiettivo 40X. Le immagini selezionate sono state quindi raccolte nella memoria digitale del sistema di analisi, e mostrate sul monitor. Una volta definito il livello di grigio corrispondente ai soli Clusters di Ag-NORs, il numero e l'area degli aggregati venivano calcolati automaticamente, ed infine i valori ottenuti erano divisi per il numero di cellule selezionate (almeno 100 cellule per ogni campione) in modo da ottenere il numero medio e l'area media degli Ag-NOR Clusters per cellula. Per ogni caso studiato, inoltre, l'area media dei Clusters di Ag-NOR per cellula, veniva rapportata all'area media dei nuclei delle cellule neoplastiche, ottenuta mediante l'utilizzo della funzione "Draw/merge" del sistema di analisi. Per ogni caso esaminato, veniva infine calcolato l'indice mitotico corretto per il volume (M/V Index) (Haapasalo et al., 1989) utilizzando sezioni colorate con EE. Venivano così studiate le correlazioni tra Ag-NOR clusters ed attività mitotica, nonché quelle tra i valori dei parametri calcolati ed il comportamento biologico dei tumori esaminati.

## **Risultati**

Istologicamente, il seminoma metastatizzato era costituito, rispetto ai seminomi non metastatizzati, prevalentemente da cellule più piccole, con nucleo ipercromatico e citoplasma debolmente basofilo a limiti ben definiti.

Il valore medio dell'area degli Ag-NOR Clusters/nucleo, variava da 3.18 a  $13.86\ \mu\text{m}^2$  nel seminoma metastatizzato (media  $6.9\pm 2.21\ \mu\text{m}^2$ ), mentre nei seminomi non metastatizzati, tale valore risultava compreso tra 3.38 e  $15.18\ \mu\text{m}^2$  (media  $8.09\pm 2.59\ \mu\text{m}^2$ ). Il numero medio di Ag-NOR Clusters/cellula risultava di  $3.32\pm 1.03$  nel seminoma metastatizzato, e di  $1.56\pm 1.04$  nel gruppo di seminomi non metastatizzati.

L'area nucleare media nel seminoma metastatizzato risultava pari a  $28 \pm 2.05 \mu\text{m}^2$ , mentre nei seminomi non metastatizzati essa risultava di  $64 \pm 2.3 \mu\text{m}^2$ ; Il rapporto area nucleare/area Ag-NOR Clusters era pari a  $7.9 \pm 1.05$  nei seminomi non metastatizzati e  $4.05 \pm 0.12$  nel seminoma metastatizzato. Le differenze tra i valori medi del numero di Ag-NOR Clusters/cellula, nonché quelli del rapporto "area nucleare/area Ag-NOR Cluster", tra il seminoma metastatizzato e quelli non metastatizzati, sono statisticamente significative.

Il M/V Index nel seminoma metastatizzato era pari a  $95.52/\text{mm}^2$ , e risultava significativamente più elevato rispetto a quello dei seminomi non metastatizzati (M/V Index =  $35 \pm 12/\text{mm}^2$ ).

### **Discussione**

Lo studio di parametri cellulari morfo-funzionali quantificabili di valore prognostico vede oggi impegnato un numero sempre crescente di ricercatori coinvolti nel campo della diagnostica oncologica sia umana che veterinaria. A tale riguardo, la ricerca di tali parametri nei tumori spontanei degli animali, non va intesa solo quale mezzo per ottenere una più alta precisione diagnostica, ma anche quale importante momento comparativo con le corrispondenti neoplasie dell'uomo. E' noto infatti che gli animali domestici rappresentano preziosi modelli di studio per i tumori umani, anche perché spesso, essi condividono con l'uomo ambienti ed abitudini di vita. Per quanto riguarda i tumori del testicolo, oltre all'uomo, soltanto il cane e gli equidi ne sviluppano spontaneamente con discreta frequenza (Galati, 1977). Per i seminomi dell'uomo e del cane, in particolare, recenti studi sembrano dimostrare che la quantificazione delle proteine Ag-NOR possa essere utilissima nell'individuare tumori a più alto potere invasivo e metastatico (Delahunt et al., 1990; De Vico et al., 1994). I dati ottenuti in questo studio, sembrano confermare il valore prognostico della quantificazione delle proteine Ag-NOR anche nei seminomi degli equidi. In particolare, i parametri più utili tra quelli esaminati, sono risultati essere il numero medio di Ag-NOR clusters/cellula e il rapporto "area nucleare/area Ag-NOR Clusters", i cui valori sono significativamente differenti, nel seminoma metastatizzato, rispetto al gruppo di seminomi non metastatizzati. Per quanto riguarda le correlazioni esistenti tra proteine Ag-NOR, ciclo cellulare ed indice mitotico, si ritiene che le *dimensioni medie* degli Ag-NOR Clusters/cellula siano proporzionali

alla velocità con cui la cellula completa il proprio ciclo (Derenzini et al., 1990); Il *numero medio* di Ag-NOR Clusters/cellula, nonché la loro distribuzione all'interno del nucleo, sembrano invece variare in relazione alla fase del ciclo cellulare, aumentando in profase ed in tarda telofase (Anastassova-Kristeva, 1977) e quindi proporzionalmente al numero di cellule in fase "M". Nel nostro studio, il riscontro di un più alto IM nel seminoma con un maggior numero di Ag-NOR clusters/nucleo (quello metastatizzato), sembra corroborare tale ipotesi, suggerendo altresì che il seminoma metastatizzato aveva una "frazione di crescita" più elevata di quelli non metastatizzati. Una situazione simile è stata riscontrata anche in alcuni seminomi di cane metastatizzati precocemente (De Vico et al., 1994) e nei cosiddetti seminomi ad alto indice mitotico dell'uomo (Delahunt et al, 1990), rafforzando così l'opinione che ulteriori e più approfonditi studi sulla cinetica cellulare nei seminomi spontanei degli animali possa fornire indicazioni utili per una migliore comprensione dei meccanismi che portano alla trasformazione neoplastica, alla invasione tissutale e alla metastasi anche nei corrispondenti tumori umani.

### **Bibliografia**

- 1) Anastassova-Kristeva M : The nucleolar cycle in man. J Cell Sci, **25**, 103-110, 1977.
- 2) Delahunt B, Mostofi FK, Sesterhenn IA, Ribas JL, Avallone FA: Nucleolar organizer regions in seminoma and intratubular malignant germ cells . Mod Pathol, **3**, 141-145, 1990.
- 3) Derenzini M, Pession A, Trerè D : Quantity of nucleolar silver-stained proteins is related to proliferating activity in cancer cells. Lab Inv, **63**, 137-140, 1990.
- 4) De Vico G, Maiolino P, Galati P : Cell proliferation indices in animal tumours - a brief review. Eur J Vet Pathol, **2**, 127-132, 1996.
- 5) De Vico G, Papparella S, Di Guardo G : Number and size of silver-stained nucleoli (Ag-NOR clusters) in canine seminomas: correlation with histological features and tumour behaviour. J Comp Pathol, **110**, 267-273, 1994.
- 6) Fakan S, Hernandez-Verdun D : The nucleolus and the nucleolar organizer regions. Biol Cell, **59**, 189-206, 1986.
- 7) Galati P: Tumori spontanei negli animali. Atti XIV Congr Naz Soc It Pat ,1-39, 1977.
- 8) Haapasalo H, Pesonen E: Volume corrected mitotic index (M/V-INDEX). The standard of mitotic activity in neoplasms. Path Res Pract, **185**, 551-554, 1989.

- 9) Howat AJ, Giri DD, Wright LA, Underwood JCE : Silver-stained nucleoli and nucleolar organizer regions count are of no prognostic value in thick cutaneous malignant melanoma. *J Pathol*, **159**, 121-127, 1988.
- 10) Nielsen SW, Lein DH: Tumours of the testis. *Bull. W.H.O.*, **50**, 71-78, 1974.
- 11) Ploton D, Menager M, Jeannesson P, Himberg G, Pigeon F, Adnet JJ: Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer regions at the optical level. *Histochem J* , **18**, 5-14, 1986.
- 12) Quinn CM, Wright NA: The clinical assessment of proliferation and growth in human tumours: evaluation of methods and applications as prognostic variables. *J Pathol*, **160**, 93-102, 1990.

# **EFFETTO DEL PENTOSAN POLISOLFATO (PPS) SU COLTURE PRIMARIE DI CONDROCITI ARTICOLARI DI CAVALLO (Effects of pentosan polysulphate on primary cultures of articular chondrocytes of horse)**

Borghetti P., De Angelis E., Martini F.M.(\*)

*Istituto di Anatomia Patologica Veterinaria;*

*Istituto di Clinica Chirurgica Veterinaria(\*), Facoltà di Medicina Veterinaria - Parma*

## **Introduzione**

Argomento di grande attualità, sia in campo umano che animale, è lo studio sull'applicazione in corso di osteoartrite di farmaci cosiddetti "condroprotettivi". Diverse sostanze vengono incluse in tale definizione per il fatto che mostrano effetto diretto sul metabolismo cartilagineo in senso anabolico e/o anticatabolico o antidegradativo (6).

Il pentosan polisolfato (PPS), conosciuto da tempo per le sue proprietà antitrombotiche e antilipidemiche, negli ultimi anni ha dimostrato effetti anabolici ed anticatabolici sul tessuto cartilagineo in vivo ed in vitro oltre che effetti stimolatori sulla produzione di acido ialuronico ed inibitori sulla risposta leucocitaria infiammatoria. Nonostante tale potenzialità terapeutica nel trattamento dell'osteoartrite, valutata in diversi studi nell'uomo e in certe specie animali (coniglio, ratto, cane) (4,5,6,7,8), nella specie equina rimangono estremamente scarsi i lavori sperimentali relativi alla valutazione della molecola *in vivo* e soprattutto *in vitro*.

Si è voluto pertanto analizzare gli effetti del PPS in vitro utilizzando modelli di colture primarie di condrociti articolari di cavallo. I dati del presente lavoro riguardano preliminari studi in cui si sono analizzati alcuni parametri generali di biologia cellulare (sintesi proteica e attività proliferativa) nell'ottica di una iniziale valutazione tossico-metabolica della molecola in funzione di un ampio range di sue concentrazioni.

## **Materiali e metodi**

### *Colture primarie di condrociti articolari*

Il tessuto cartilagineo articolare è stato ottenuto da articolazioni metacarpo-falangee di cavalli di età compresa tra 4-6 anni regolarmente macellati; sono state utilizzate solo articolazioni senza alcun tipo di lesione macroscopicamente evidenziabile. La cartilagine articolare, prelevata in condizioni sterili, è stata finemente sminuzzata e

raccolta in medium (D-MEM) contenente penicillina (100 U/ml), streptomina (100 µg/ml) e anfotericina B (2.5 µg/ml) a 37°C. Dopo incubazione in 0,1 % di pronasi (Sigma) per 1 ora, il tessuto cartilagineo è stato digerito con collagenasi tipo IA allo 0.2% (Sigma) in D-MEM per 2 ore a 37°C. Il materiale digerito è stato filtrato attraverso due filtri successivi rispettivamente di 100 e 20 µm e la sospensione cellulare così ottenuta è stata centrifugata a 1500 rpm per 10 min. Il pellet cellulare è stato lavato diverse volte con D-MEM più 10% di FCS (fetal calf serum) (GIBCO) ed i condrociti ottenuti sono stati seminati in D-MEM più 10% FCS ad alta densità ( $15 \times 10^4 / \text{cm}^2$ ) per la valutazione della sintesi proteica ed a media densità ( $5 \times 10^4 / \text{cm}^2$ ) per la proliferazione cellulare in vassoi multipozzetto ( $4 \text{ cm}^2 / \text{pozzetto}$ ).

### ***Trattamento con pentosan polisolfato (PPS)***

Le colture di condrociti dopo la semina sono state coltivate in D-MEM più 10% di FCS per alcuni giorni. Successivamente le colture sono state trattate con medium completo senza (controlli) o contenente pentosan polisolfato alle concentrazioni di 1 • g/ml, 10 • g/ml, 100 • g/ml e 200 • g/ml per periodi di tempo indicati nei singoli esperimenti.

### ***Proliferazione cellulare***

La proliferazione cellulare è stata valutata in colture di condrociti seminati a media densità per un periodo di trattamento di 7 giorni iniziato 2 giorni dopo la semina (giorno 0 in Fig.1) della coltura primaria. Al 3° giorno di trattamento è stata somministrazione medium completo fresco (D-MEM + 10% di FCS) a tutte le colture. Le cellule sono state staccate enzimaticamente (0,1% pronasi e 0,1% collagenasi) e contate in camera di Burker dopo 1, 2, 4 e 7 giorni di trattamento.

### ***Velocità di sintesi proteica***

La velocità di sintesi proteica è stata valutata in colture di condrociti trattati meno con PPS dopo una settimana di coltura ed è stata come incorporazione di  $^3\text{H}$ -leucina (0.8mM; 2 µCi/ml) (Amersham,Bucks, U.K.) durante un incubazione di 30' delle cellule in medium completo. Al termine di tale incubazione, il tappeto cellulare è stato lavato per tre volte con una soluzione salina (EBSSG) a 4°C e le macromolecole sono precipitate con acido tricloroacetico (TCA) al 10% e a 4°C. Il precipitato è poi dissolto in NaOH 0,2N e la radioattività presente nella frazione acido-insolubile è determinata per mezzo di uno scintillatore in fase liquida. Il contenuto di proteine è determinato con il metodo Bio-Rad (1).

## Risultati

La Fig. 1 mostra i risultati relativi all'attività proliferativa di condrociti articolari coltivati per una settimana in presenza o assenza (controlli) di PPS nel medium di coltura: le colture trattate con 1 e 10  $\mu\text{g/ml}$  di PPS non mostrano differenze nel ritmo proliferativo, né come numero totale di cellule ai diversi punti sperimentali né come efficacia di adesione al substrato (valutabile nei primi 4 giorni di coltura), né come capacità di rispondere allo stimolo mitogeno dovuto alla somministrazione di medium completo fresco (giorno 0 e giorno 4 del periodo di trattamento). Le colture trattate con 100 e 200  $\mu\text{g/ml}$  di PPS raggiungono dopo 7 giorni di trattamento un numero cellulare inferiore ai controlli; questo fenomeno potrebbe dipendere più da un problema di interferenza del PPS sull'adesione alla plastica colturale (effetto già presente nelle prime 24 ore e persistente anche al 2° giorno di trattamento nelle colture esposte a 200  $\mu\text{g/ml}$  di PPS) e conseguente parziale distacco di cellule piuttosto che ad un effetto inibitorio diretto nelle successive fasi proliferative. Alla concentrazione più elevata (200  $\mu\text{g/ml}$  di PPS) appare evidente un certo effetto inibitorio anche sull'attività proliferativa soprattutto come risposta allo stimolo mitogeno del medium fresco.

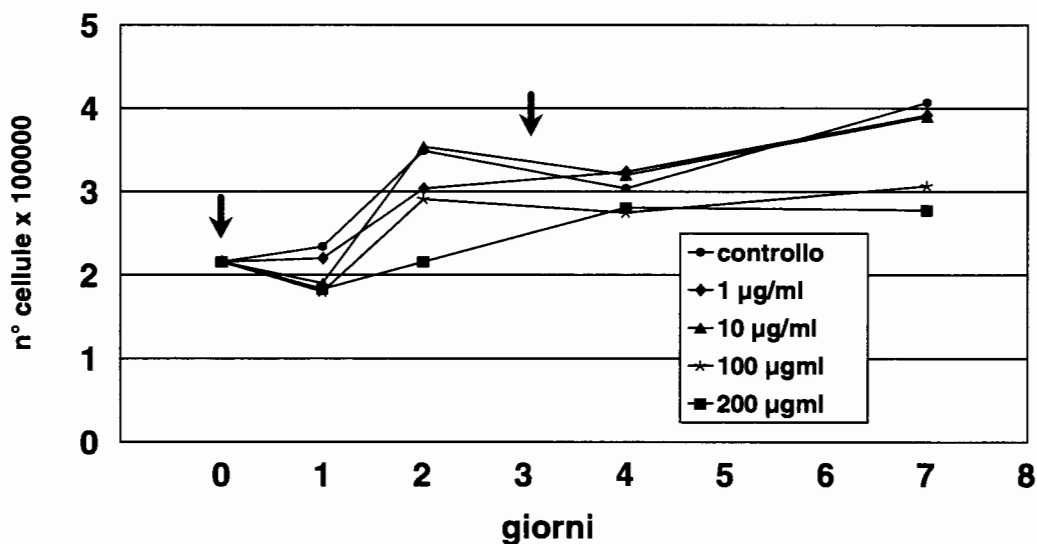


Fig. 1: Curve di proliferazione di condrociti articolari di cavallo coltivati per 7 giorni in assenza (controllo) o presenza di 1, 10, 100, 200  $\mu\text{g/ml}$  di PPS. La freccia indica il giorno di somministrazione di medium completo.

I dati relativi alla velocità di sintesi proteica delle colture di condrociti articolari mostrano un comportamento metabolico del condrocita in risposta alla presenza di PPS abbastanza simile nelle diverse concentrazioni di PPS utilizzate almeno per

quanto riguarda le concentrazioni più elevate. Si assiste ad un incremento della velocità di sintesi proteica a tempi brevi di trattamento (24 ore) mentre tale fenomeno tende successivamente a stabilizzarsi su valori decisamente più bassi ma sempre leggermente superiori alle colture di controllo.

L'incremento della sintesi proteica alle 24 ore di trattamento appare del tutto simile nelle colture trattate con 10, 100 e 200  $\mu\text{g/ml}$  di PPS (Fig. 2 e 3) mentre appare più limitato in quelle trattate con 1  $\mu\text{g/ml}$  di PPS (Fig. 1).

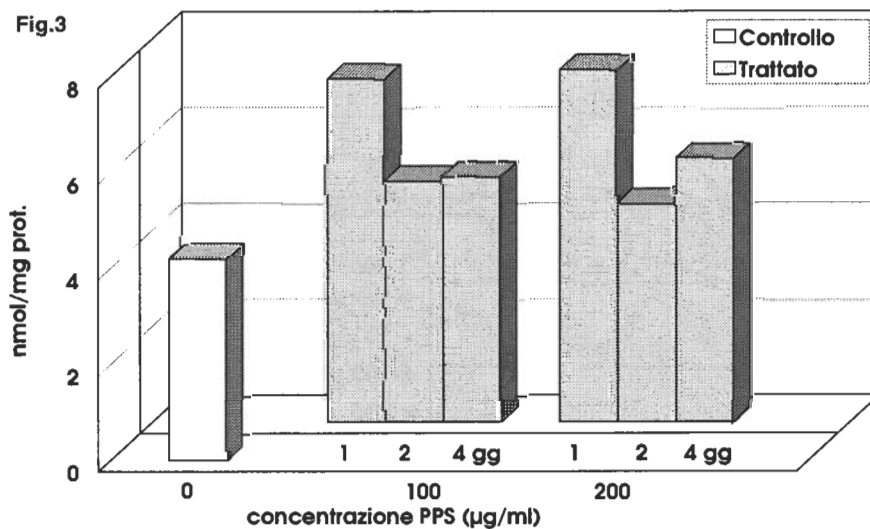
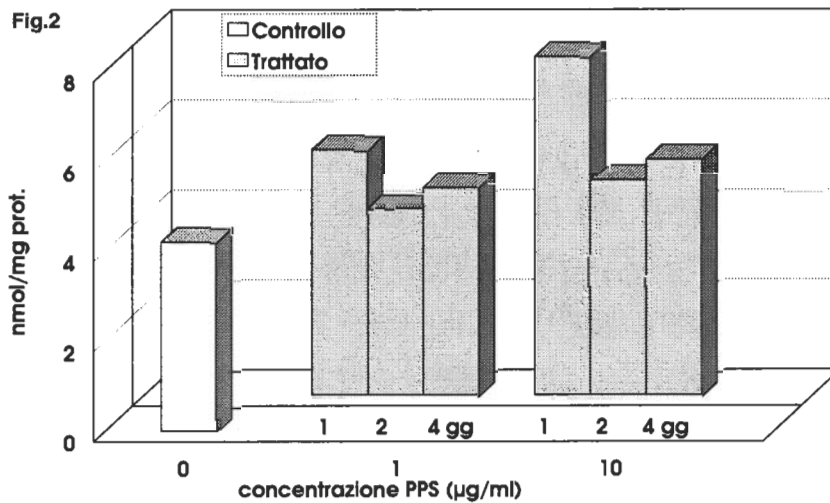


Fig. 2 e 3: Velocità di sintesi proteica in condrociti articolari di cavallo dopo 1, 2, 4 giorni in di trattamento a 1 e 10  $\mu\text{g/ml}$  (Fig.2) e 100 e 200  $\mu\text{g/ml}$  (Fig.3)

## Discussione

Dai risultati ottenuti seppur preliminari e limitati ad una valutazione di parametri generali di fisiologia cellulare, si possono desumere alcune importanti considerazioni sull'influenza che il pentosan polisolfato (PPS) può avere sul metabolismo del condrocita articolare di cavallo *in vitro*.

Innanzitutto non si sono rilevati effetti dannosi sull'attività proliferativa e di sintesi proteica utilizzando tempi di trattamento di una certa durata e un ampio range di concentrazioni di PPS. Solo a concentrazioni molto elevate (200 µg/ml) si può assistere ad un certo effetto negativo sull'adesione cellulare *in vitro* e ad un rallentamento del ritmo proliferativo con il perdurare del trattamento. Inoltre l'effetto anabolico sulla velocità di sintesi proteica appare indipendente dalle concentrazioni della molecola oltre i 10 µg/ml.

Su tale base si può affermare che dosaggi intorno ai 10 µg/ml possono già risultare particolarmente efficaci e privi di effetti potenzialmente dannosi; tale riscontro trova analogie nei dati di altri autori, seppur in altri sistemi cellulari (2,3).

Altra considerazione riguarda l'efficacia del trattamento nel tempo con mantenimento di un effetto anabolico almeno fino al 4° giorno di trattamento.

Entrambi i dati, se confermati da analoghi riscontri nelle sintesi macromolecolari più specifiche (es. collagene e proteoglicani) e per tempi più lunghi, potranno fornire una importante base di valutazione per la somministrazione del PPS *in vivo*.

## Bibliografia

- 1) Borghetti P., Della Salda L., De Angelis E., Maltarello M.C., Petronini P.G., Cabassi E., Marcato P.S., Maraldi N.M., Borghetti A. F.. Adaptive cellular response to osmotic stress in pig articular chondrocytes. *Tissue & Cell* (1995), 27, 173-183.
- 2) Collier S., Ghosh P. Evaluation of the effects of antiarthritic drugs on the secretion of proteoglycans by lapine chondrocytes using a novel assay procedure. *Ann Rheum Dis*, 1989, 48, 372-381.
- 3) Costeseque R., Emonds-Alt X., Breliere J.C.: Polysulphated polysaccharides: an *in vitro* study of their effects on proteoglycan biosynthesis by articular chondrocytes. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 1986, 282, 196-208.
- 4) Francis DJ, Forrest MJ, Brooks PM: Retardation of articular cartilage degradation by glycosaminoglycan polysulfate (Arteparon), pentosan polysulfate (SP54), and DH4OJ in the rat air pouch model. *Arthritis Rheum.*, 1989, 32, 608-616.

- 5) Francis DJ, Hutadilok N, Kongtawelert P: Pentosan polysulphate and glycosaminoglycan polysulphate stimulate the synthesis of hyaluronan in vivo. *Rheumatol. Int.*, 1993, 13, 61-64.
- 6) Little C, Ghosh P: Potential use of pentosan polysulphate for treatment of equine joint disease. In "McIlwraith and Trotter: Joint disease in the horse. WB Saunders Company, 1996, 281-292.
- 7) Rogachefsky R.A., Dean D.D., Howell D.S., Altman R.D. Treatment of canine osteoarthritis with insulin-like growth factor (IGF-1) and sodium pentosan polysulfate. *Osteoarthritis-Cartilage*, 1993, 1, 105-114.
- 8) Smith MM, Ghosh P, Numata Y: The effects of orally administered calcium pentosan polysulphate on inflammation and cartilage degradation produced in rabbit joints by intra-articular injection of a hyaluronate-polylysine complex. *Arth. Rheum.*, 1993, 37,125-136.

## LA PATOLOGIA RENALE NEI CAVALLI MACELLATI

Luciana Mandrioli, Giuliano Bettini, Paolo Stefano Marcato  
*Università degli Studi di Bologna- Facoltà di Medicina Veterinaria*  
*Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale*  
*Sezione di Patologia Generale e Anatomia Patologica*

Per le più comuni specie animali da macello sono disponibili numerosi studi casistici, che descrivono analiticamente i rilievi anatomopatologici osservabili post mortem nei principali apparati. Lo scopo di tali studi è generalmente quello di fornire, al veterinario pratico che lavora al macello, punti di riferimento aggiornati per l'interpretazione delle lesioni riscontrabili nella quotidiana pratica ispettiva. Nella specie equina tali indagini sono però piuttosto rare, ed in particolare nella bibliografia non è stato possibile ritrovare studi sull'incidenza e la tipologia delle lesioni renali nei cavalli da macello, mentre sono piuttosto numerosi i lavori che descrivono i riscontri anatomoistopatologici di nefropatie clinicamente apparenti.

E' stato pertanto condotto uno studio anatomoistopatologico sulle lesioni renali osservate in 308 cavalli da carne (133 adulti e 175 puledri) allevati in Polonia allo stato brado e macellati subito dopo l'importazione presso il Pubblico Macello di Modena.

Lo stato generale degli animali è risultato soddisfacente (nessun sequestro dell'intera carcassa), sebbene nei visceri sottoposti ad ispezione sanitaria fossero frequentemente presenti lesioni anche importanti, rappresentate per lo più da broncopolmoniti purulente che da esami microbiologici a campione sono risultate associate all'isolamento di *Streptococcus zooepidemicus*.

L'esame ispettivo dei reni (esame esterno dopo scapsulamento, esame dopo sezione a tutto spessore fino all'apertura del bacinetto in entrambi i reni di ogni animale) ha messo in evidenza alterazioni macroscopicamente apprezzabili in 63 soggetti (20,4%). Le lesioni riscontrate erano generalmente bilaterali ed in diversi casi (19/63) si è riscontrata la presenza di più di una tipologia lesiva nello stesso organo, per cui complessivamente si sono registrate 84 lesioni.

Le lesioni riscontrate erano rappresentate da aree retratte in 30 casi su 63 (47,6%), in 18 delle quali prevaleva un aspetto di semplice retrazione cicatriziale, mentre in 12

casi erano presenti aree biancastre leggermente retratte e di consistenza fibrosa cui corrispondeva in sezione un aspetto a cuneo o a strie radiali. In quattro casi (6,3%) la superficie renale presentava invece aree pallide più o meno estese e dai limiti mal definiti che conferivano all'organo un aspetto variegato. In tre casi (4,8%) si sono riscontrati piccoli focolai nodulari rilevati biancastri, rotondeggianti in sezione, del diametro di circa un centimetro ed in sette reni (11,1%) erano presenti piccole cisti corticali ripiene di liquido chiaro.

In 20 casi (20/63: 31,7%) i reni si presentavano leggermente rigonfi nel loro aspetto generale e di un colore nocciola chiaro molto più pallido del normale. In questi organi la sezione evidenziava lo stesso aspetto degenerato in tutta la corticale, che presentava talvolta irregolarità di spessore ed in cui erano spesso eccessivamente riconoscibili i glomeruli. In un numero più ridotto (2/63:3,2%) i reni presentavano una colorazione brunastra più scura del normale.

In 4 casi (6,3%) nella midollare e nelle papille renali erano apprezzabili striature radiali brunastre o biancastre, mentre in 3 casi (4,8%) le papille renali apparivano edematose e con una sfumatura giallognola. Nel bacinetto renale non si sono mai ritrovati calcoli.

Il successivo esame istologico, eseguito su sezioni di 5 micron di spessore ottenute da pezzi fissati in formalina tamponata e colorate con ematossilina eosina e, quando reputato necessario, con colorazioni speciali (Gomori, PAS, Masson, Rosso Congo, Blu di Toluidina, PTAH) ha permesso di caratterizzare con maggiore precisione la natura delle lesioni.

Le 30 lesioni macroscopiche di retrazione corticale corrispondevano istologicamente ad aree di fibrosi interstiziale e di atrofia nefronale in sette casi (23,4%), probabile conseguenza di pregressi infarti, considerata anche la contemporanea presenza in alcuni di questi casi di arteriopatie subostruttive nel limite fra corticale e midollare. Nei rimanenti 23 casi (76,6%) le lesioni sono state interpretate come focolai di nefrite interstiziale cronica caratterizzati da una intensa deposizione interstiziale di connettivo fibroso, nel cui contesto erano individuabili sparsi aggregati linfocitari, associata ad una marcata dilatazione, talora addirittura cistica, dei tubuli renali, che presentavano epitelio appiattito e frequente ristagno intraluminale di materiale amorfo debolmente acidofilo.

I quattro focolai biancastri non retratti corrispondevano a fatti nefritici non cronicizzati (infiltrazione interstiziale perivascolare e periglomerulare di linfociti con minimale deposizione di collagene) associati a fatti degenerativi nefronali. Le lesioni nodulari della corticale sono risultate in due casi noduli di tessuto linfatico con una regolare organizzazione follicolare, interpretati come probabili ectopie di tessuto, ed in un caso un piccolo adenoma papillare.

I 20 reni che apparivano macroscopicamente pallidi hanno mostrato all'istologia quadri di degenerazione tubulare di gravità variabile (rigonfiamento cellulare, vacuolizzazioni citoplasmatiche, distacco degli elementi epiteliali dalla membrana basale) interpretabili come la conseguenza di fatti tossici o anossici sistemici, a cui erano spesso associati anche aspetti di sofferenza glomerulare.

Le papille renali hanno presentato in 12 casi (19%) aspetti di edema interstiziale, che solo in tre casi era stato sospettato macroscopicamente sulla base dell'aspetto rigonfio delle papille. Parimenti in 12 casi (19%) si è rilevata nella midollare la deposizione di precipitati intratubulari calcifici (nefrocalcinosi), che tuttavia solamente in tre casi era di entità tale da poter essere apprezzata dal punto di vista macroscopico, sulla base della presenza di strie biancastre radiali nella midollare.

Nei due casi in cui i reni apparivano scuri, l'esame istologico ha svelato la diffusa presenza di pigmenti granulari bruno-verdognoli nel citoplasma dei tubuli renali (tubulonefrosi emopigmentaria).

Le lesioni a focolaio non hanno evidenziato nessuna correlazione con altre patologie eventualmente presenti in altri organi, mentre in due casi si è constatata l'associazione fra quadri di broncopolmonite acuta particolarmente gravi (interessamento di più di metà del parenchima polmonare) e la presenza di lesioni a carattere degenerativo nel rene, oltre che nel fegato e nel miocardio.

Sulla base dei riscontri anatomoistologici si può concludere che in cavalli con nessuna evidenza clinica e presentati alla macellazione sono presenti nefropatie in un numero rilevante di casi. Nei casi da noi esaminati le lesioni presenti nei reni, seppure ben apprezzabili sia macroscopicamente che microscopicamente, erano comunque di lieve entità e ben lontane dal poter essere in grado di determinare autonomamente un risentimento sistemico.

## EPATOBLASTOMA IN UN PULEDRO

Cantile C<sup>1</sup>, Arispici M<sup>1</sup>, Abramo F<sup>1</sup>, Incastrone G<sup>2</sup>, Pellegrini D<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Dipartimento di Patologia Animale Profilassi e Igiene degli Alimenti - Facoltà di Medicina Veterinaria - Università degli Studi di Pisa. <sup>2</sup>Libero Professionista.

### Introduzione

L'epatoblastoma è il tumore epatico più frequente nel bambino costituendo quasi il 50% dei tumori epatici infantili e circa il 27% di tutte le neoplasie dell'età pediatrica.<sup>12</sup> Nei bambini l'epatoblastoma è spesso associato ad alcune malformazioni, quali l'emipertrofia, la macroglossia, diverse anomalie cardiache e renali, il tumore di Wilms e a dismetabolismi primitivi genotipici.<sup>8</sup> In alcuni casi possono insorgere sindromi ipoglicemiche, policitemia o virilizzazione per sintesi da parte del tessuto neoplastico di insulina, eritropoietina o gonadotropine.<sup>8</sup>

Generalmente la neoplasia si presenta come massa singola nell'80% dei casi, con dimensioni fino a 15 cm e oltre e peso superiore al chilogrammo.<sup>12</sup> Istologicamente, l'epatoblastoma viene classificato in tipo epiteliale e tipo misto epiteliale e mesenchimale. Il tipo epiteliale viene a sua volta distinto in *a*) fetale, *b*) fetale ed embrionale, *c*) macrotrabecolare e *d*) a piccole cellule indifferenziate. Il tipo misto può presentare o meno aspetti di tipo teratoide.<sup>12</sup> Spesso sono presenti focolai di ematopoiesi extramidollare.

In oncologia veterinaria sono stati segnalati solo sporadici casi di epatoblastoma negli agnelli (2 casi),<sup>5</sup> nei suini (2 casi)<sup>3</sup> e nel cavallo (2 casi).<sup>9, 7</sup> Casi singoli sono stati descritti nel bovino<sup>10</sup> e nel cane.<sup>13</sup>

La presente segnalazione riporta i dati clinici ed anatomopatologici di un caso di epatoblastoma di tipo misto con evidente attività emopoietica in un puledro.

### Descrizione del caso

#### *Storia clinica*

Un puledro purosangue inglese di 10 mesi d'età ha presentato anoressia ed episodi di diarrea alternata a stipsi che non rispondevano a ripetuti trattamenti antiparassitari e antibiotici. Alla visita clinica l'animale presentava lieve tachicardia,

dispnea, turgore del circolo venoso e temperatura di 39,5 °C. Ripetuti esami ematologici hanno mostrato policitemia, aumento del contenuto emoglobinico e dell'ematocrito. I valori alla 2<sup>a</sup> e 16<sup>a</sup> giornata erano rispettivamente di  $17,71 \times 10^6/\mu\text{L}$  e  $19,48 \times 10^6/\mu\text{L}$  (normale intervallo di riferimento:  $6,5-13 \times 10^6/\mu\text{L}$ ), 18,7g/dL e 22,7g/dL (intervallo normale: 12-19g/dL) e 60,8% e 73,4% (intervallo normale: 32-53%). I leucociti hanno superato il limite massimo di riferimento ( $12 \times 10^3/\mu\text{L}$ ) in 6<sup>a</sup> giornata raggiungendo il valore di  $18,5 \times 10^3/\mu\text{L}$  in 14<sup>a</sup> giornata. La stima delle piastrine non ha mostrato valori esterni all'intervallo di riferimento. Ripetuti strisci ematici hanno mostrato numerosi dei neutrofilii segmentati e assenza di elementi immaturi. I valori dell'emogramma non si sono sostanzialmente modificati nonostante una protratta e continua terapia reidratante endovenosa (Ringer lattato, 20-25L/die). Anche i valori di alcuni parametri biochimico-clinici sono risultati elevati e con concentrazioni tendenzialmente crescenti in rapporto alla progressione della malattia. In particolare, la creatininemia ha raggiunto i 4,7mg/dL, la bilirubinemia totale i 6,0mg/dL, la lattato deidrogenasi (LDH) le 1100U/L, la gamma glutamil transpeptidasi ( $\gamma\text{GT}$ ) le 181U/L e la aspartato amino transferasi (AST) le 786U/L. Durante tale periodo l'animale era costantemente anoressico e dispnoico ed era evidenziabile sangue occulto nelle feci. Alla terapia reidratante sono stati associati antibiotici ad ampio spettro (gentamicina, cefalosporine e metronidazolo) e antistaminici anti- $\text{H}_2$ . Le analisi delle urine sono risultate sempre nella norma. In 16<sup>a</sup> e 17<sup>a</sup> giornata, il puledro ha manifestato diarrea emorragica ed è deceduto in 18<sup>a</sup> giornata.

### *Esame anatomopatologico*

Alla necropsia era evidenziabile congestione delle mucose congiuntivali, schiuma biancastra dalle narici e imbrattamento emorragico perianale. In cavità addominale era presente liquido ascitico (circa 5 litri) ed era evidente una marcata congestione pluriviscerale e trombosi del sistema portale. Era presente enterite emorragica diffusa con materiale alimentare scarso, liquido e sanguinolento. La milza risultava ridotta di volume, mentre i reni erano megalici con precipitati calcarei nel bacinetto. Il fegato appariva modificato per la presenza di una massa rotondeggiante a livello del lobo sinistro. La neoformazione risultava ben capsulata, bianco-giallastra, consistente e delle dimensioni di circa 12-14 cm di diametro. Al taglio era variegata con emorragie e alcune lacune ematiche, miste ad aree di tessuto grigiastro di

consistenza cedevole e altre simili a tessuto epatico congesto. Frammiste a queste aree erano osservabili sottili strutture di consistenza ossea, scricchiolanti al taglio. Ulteriori lesioni rinvenute alla necropsopia erano costituite da edema polmonare, idropericardio e congestione del comparto venoso toracico e cervicale.

Varie porzioni di tessuto neoplastico, aree adiacenti di parenchima epatico rispettato, linfonodi ilari epatici e mediastinico caudale sono stati fissati in formalina neutra tamponata al 10% e inclusi in paraffina. Alcuni campioni di tessuto neoplastico sono stati sottoposti a decalcificazione con HCl al 5% e Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 5% per 2 giorni. Le sezioni di 5µm sono state colorate con i seguenti metodi: ematossilina-eosina, Gomori per le fibre reticolari, acido periodico-reattivo di Schiff, tricromica secondo Goldner, metodo di Schmorl, May-Grunwald-Giemsa. Sezioni rappresentative di tessuto neoplastico non sottoposto a decalcificazione e tessuto epatico normale, sono state sottoposte a indagini di immunistochemical secondo la metodica perossidasi-anti-perossidasi, utilizzando i seguenti anticorpi: citocheratine (CK) AE1, 19 (monoclonali); antigene embrionale di membrana (EMA) (monoclonale); alfa-fetoproteina (AFP) e antigene carcinoembrionario (CEA) (policlonali).

Il quadro istologico della neoplasia si presentava notevolmente complesso con aree organoidi di natura epiteliale, aree di tessuto mesenchimale di tipo fibroso e aree di tessuto condroide e osseo. Le porzioni di origine epiteliale apparivano a struttura alveolare ed erano costituite da cellule con scarsa coesività, raggruppate a nidi o disposte in formazioni cordonali dello spessore di 2-3 cellule, con scarso o assente stroma reticolare e numerosi capillari ematici. Il citoplasma delle cellule era abbondante, conteneva una scarsa quantità di glicogeno ed era evidente una discreta distinzione della membrana citoplasmatica. I nuclei apparivano grandi, lievemente pleomorfi, con marginazione della cromatina e 1-2 nucleoli ben evidenti. In generale, il loro aspetto non appariva particolarmente dissimile dagli epatociti normali. In alcune aree le cellule contenevano voluminose vacuolizzazioni uniche o più raramente multiple, nettamente rotondeggianti e otticamente vuote. Accanto a questi elementi cellulari erano anche presenti numerose cellule con nucleo picnotico e citoplasma marcatamente eosinofilo, estesi fenomeni carioretici, detriti nucleari ed esiti della citolisi.

Il tessuto mesenchimale appariva strettamente commisto alle porzioni epiteliali e mostrava strutture lamellari osteoidi anche mineralizzate, tessuto connettivo con

aspetti mixoidi e riccamente vascolarizzato e cellule a differenziazione condroide. Particolarmente in corrispondenza di queste ultime strutture erano evidenti addensati di elementi cellulari di tipo mieloide. Tra questi erano distinguibili numerosi elementi della serie eritroblastica, emazie, alcune cellule della linea leucocitaria e megacariociti. Alcuni focolai di ematopoiesi extramidollare erano anche presenti nel contesto delle strutture di origine epiteliale sopra descritte.

Il tessuto neoplastico risultava nettamente incapsulato da spesse strutture connettivali e non mostrava tendenza invasiva. Nel tessuto epatico periferico al tumore era osservabile proliferazione dei dotti biliari, dilatazione delle strutture venose e ispessimento della parete delle arteriole, lieve fibrosi portale e atrofia parenchimale con depositi di lipofuscina prevalentemente a carico degli epatociti pericentrolobulari. Nessun focolaio metastatico è stato osservato a livello linfonodale.

Le cellule neoplastiche di natura epiteliale sono risultate focalmente immunoreattive alla CK AE1, all'AFP e al CEA, mentre sono risultate negative alla CK19 e all'EMA. Il tessuto epatico normale periferico alla massa neoplastica è sempre risultato negativo, mentre una netta positività alla CK AE1 è stata espressa dalle cellule dei dotti biliari.

## **Discussione**

Le caratteristiche istomorfologiche della neoplasia sono riferibili all'epatoblastoma di tipo misto con aspetti teratoidi.<sup>4</sup> Il tumore appare costituito sia da una componente epiteliale riconducibile a cellule di tipo fetale<sup>12</sup> che da una componente mesenchimale differenziata in tessuto connettivo, cartilagineo e osseo. Non sono stati osservati elementi cellulari riconducibili alla componente embrionale dell'epatoblastoma. Particolarmente evidente è risultata la componente cellulare di tipo mieloide che potrebbe giustificare il riscontro ematologico degli elevati valori dell'ematocrito, nonché l'insorgenza della trombosi portale e dell'enterite emorragica. La presenza di focolai di ematopoiesi extramidollare, quantomeno in patologia umana, è sempre associata all'epatoblastoma di tipo fetale<sup>11</sup> e modificazioni dell'emogramma costituiscono una complicità nell'epatoblastoma dell'uomo.<sup>8</sup> Tale alterazione non è mai stata riportata in letteratura negli animali.

Le elevate concentrazioni sieriche della  $\gamma$ GT possono essere riconducibili alla fibrosi portale e alla neoproliferazione dei dotti biliari del parenchima epatico periferico alla neoplasia.<sup>9</sup>

L'epatoblastoma di tipo misto descritto in un castrone di 3 anni ha determinato l'insorgenza di metastasi a livello omentale, mesenterico e polmonare<sup>9</sup> e anche nel tipo epiteliale descritto in un feto equino nato morto sono state evidenziate micrometastasi al linfonodo tracheobronchiale.<sup>7</sup> Nessuna metastasi si è verificata nel nostro caso e il tumore risultava inoltre ben differenziato. Nel bambino la prognosi è correlata alla precocità della diagnosi e a un intervento chirurgico radicale preceduto dalla chemioterapia. La guarigione, in questi casi, può raggiungere addirittura il 100%, essendo il tumore di solito unico e localizzato.<sup>6</sup> La malignità nel nostro caso non sembrava correlata al tipo istologico, quanto alle alterazioni ematologiche conseguenti al tumore stesso.

Relativamente all'istogenesi, si ritiene che l'epatoblastoma misto origini da cellule totipotenti capaci di differenziarsi sia nella componente epiteliale che mesenchimale.<sup>1</sup>

I risultati immunocitochimici di questo caso sono compatibili con i dati relativi all'epatoblastoma dell'uomo riportati in letteratura, per i quali le cellule epiteliali risultano immunoreattive alle CK a basso peso molecolare, all'AFP e al CEA.<sup>2</sup> La negatività all'immunoreazione per l'EMA può essere imputabile sia al grado di differenziazione delle cellule neoplastiche, sia alle modificazioni tessutali dovute alla fissazione, sia alla scarsa sensibilità dell'anticorpo monoclonale utilizzato, oppure a differenze interspecifiche di reattività ai diversi marker tumorali.

## **Bibliografia**

- 1) Abenzoa P, Manivel JC, Wick MR, Hagen K, Dehner LP: Hepatoblastoma: an immunohistochemical and ultrastructural study. *Hum Pathol*, **18**, 1025-1035, 1987.
- 2) Cangiarella J, Greco MA, Waisman J: Hepatoblastoma. Report of a case with cytologic, histologic and ultrastructural findings. *Acta Cytol*, **38**, (3), 455-458, 1994.
- 3) Hayashi M, Ishihara R, Nishio O: Histopathological examination of spontaneous tumors in slaughtered animals. *Proc Ann Meet Jpn Cancer Assoc*, **38**, 103-108, 1979.
- 4) Manivel C, Wick MR, Abenzoa P, Dehner LP: Teratoid hepatoblastoma. The nosologic dilemma of solid embryonic neoplasms of childhood. *Cancer*, **57**, (11), 2168-2174, 1986
- 5) Manktelow BW: Hepatoblastomas in sheep. *J Pathol Bacteriol*, **89**, 711-714, 1965.

- 6) Martínez Ibáñez V, Marqués Gubern A, de Diego M, Sánchez de Toledo J, Boix-Ochoa J: Hepatoblastoma today. Our experience. *Cir Pediatr*, **9**, (1), 10-12, 1996
- 7) Neu SM: Hepatoblastoma in an equine fetus. *J Vet Diagn Invest*, **5**, 634-637, 1993.
- 8) Pollice L: Tumori. In Rugge M, Pollice L: *Basi Morfologiche della Patologia del Fegato*. USES, Firenze, pp. 217-218, 1990.
- 9) Prater PE, Patton CS, Held JP: Pleural effusion resulting from malignant hepatoblastoma in a horse. *J Am Vet Med Assoc*, **194**, (3), 383-385, 1989.
- 10) Rao PR, Sriraman PK, Naidu NRG: Note on hepatoblastoma in a breeding bull. *Indian J Anim Sci*, **50**, 762-764, 1980.
- 11) Rosai J: *Ackerman's Surgical Pathology*. 7a ed. The C.V. Mosby Co., St. Louis, pp. 714-716, 1989.
- 12) Stocker JT: Hepatic tumors in children. In Suchy FJ (Ed): *Liver Disease in Children*. Mosby, St. Louis, pp. 901-929, 1994.
- 13) Usuda H, Tanoue S: Hepatoblastoma with a large cyst in a dog. *J Jpn Vet Med Assoc*, **47**, (1), 43-46, 1994.

## SU UNA RARA MALFORMAZIONE INTESTINALE DEL CAVALLO

P. Riccaboni\*, E. Scanziani\*, P. Mayer\*\* e S. Tassan\*\*

\* *Istituto di Anatomia Patologica Veterinari e Patologia Aviare. Università degli studi di Milano* \*\**Liberi professionisti.*

I diverticoli intestinali congeniti non sono del tutto rari negli equini. Localizzazione costante, in quanto rappresenta un residuo non completamente regredito del dotto onfalo-mesenterico, possiede il c.d. diverticolo di Meckel o fistula omphalo-enterica incompleta interna, di forma per lo più cilindrica, decorso di estensione variabile (talvolta compreso entro piccolo meso), estremità distale solitamente arrotondata, apertura prossimale in corrispondenza dell'ileo, ad una distanza da 20 cm ad 1 m dalla valvola ileociecale. In caso di persistenza del dotto onfalo-mesenterico e di mancata chiusura dell'ombelico può ritrovarsi, anche dopo la nascita, una fistola completa (fistula omphalo-enterica completa) che mette in comunicazione l'ileo con la cute ventrale, consentendo l'eliminazione di muco e feci attraverso una sorta di "ano ombelicale". Altre volte il dotto onfalo-mesenterico è incompleto, per una sua chiusura ileale, mentre rimane aperto, come fistula omphalo enterica incompleta esterna, nel tratto distale (ombelicale); oppure il dotto persistente è chiuso alle due estremità dando origine ad una o più cisti onfalo-mesenteriche piene di secreto mucoso.

Nel cavallo sono stati descritti, nel passato, sia la fistola onfaloenterica completa che diversi casi di diverticolo di Meckel, questi ultimi di forma cilindrica oppure globosa e con parete strutturata come quella dell'ileo (Godlück 1967). In un lontano lavoro di Hahn (1877) è menzionato, nel cavallo, un diverticolo di Meckel assai dilatato e di aspetto gastro-simile, della capienza di circa 7 litri.

Altri diverticoli, non derivanti dal dotto onfalo-mesenterico, possono formarsi in qualunque sede del tenue o del colon. Di questi deve sempre essere provata l'origine congenita. Va escluso, inoltre, che all'origine di queste dilatazioni possano esistere impedimenti meccanici ovvero anatomici che darebbero luogo, semmai, a dilatazioni secondarie; inoltre, la parete del diverticolo deve possedere una struttura del tutto simile a quella normale dell'intestino.

A seconda della forma presentata si parla di dilatazioni sacciformi, di diverticolo doppio, di diverticolo ad ansa, o fusiforme ecc.. Nella letteratura veterinaria, di tali

diverticoli vengono riportate alcune segnalazioni che meritano di essere ricordate brevemente.

Un diverticolo doppio è stato constatato da Joest (1910) nel piccolo colon di un cavallo. Dall'ansa intestinale fuoriuscivano 2 strutture sacciformi, simmetriche e contrapposte, ciascuna delle dimensioni di una testa di bambino, le cui pareti erano costituite da sierosa, muscolare e mucosa. Thieme (1955) ha osservato un'analogha malformazione, a sede duodenale, in un suino macellato.

Sempre nel cavallo, Schmidt (1940) ha segnalato due differenti formazioni diverticolari. In un soggetto anziano era presente un'ansa diverticolare del retto: detta malformazione, preceduta da una stretta ansa colon-rettale, emergeva, dirigendosi e chiudendosi verso l'alto, proprio dalla curvatura ventrale della stessa ansa. In un soggetto di 6 anni era presente, invece, una serie di 8 diverticoli fusati a sede digiunale, collegati tra loro da tratti ristretti del viscere.

I diverticoli da confluenza sono dilatazioni enteriche singolari, finora descritte solo in suini sani macellati (Joest, 1905; Aser, 1918; Kitt, 1923). Nel caso osservato da Joest, alla formazione del diverticolo concorrevano 2 anse vicine del colon e 6 dell'ileo. Quello descritto da Aser riguardava un suinetto di 2 mesi e 1/2, in cui alcune anse ileali erano coinvolte nella formazione di una concamerazione comune delle dimensioni di circa un pugno. In due casi, Kitt trovò una sacca dilatata, simile allo stomaco, che derivava dalla fusione di 3 anse del piccolo intestino e presentava di conseguenza 6 aperture. Sempre nel trattato di Kitt (1923), è riportata, a pag. 347 (fig. 161), la fotografia di un diverticolo da confluenza formato da due anse del tenue di un suino che, nel loro punto di fusione, davano luogo ad una caratteristica dilatazione.

Fusioni acquisite di tratti intestinali potrebbero essere talvolta causate, secondo Kitt (1923) e Godlück (1967), da corpi estranei che, perforando le pareti di anse vicine, ne determinano prima l'aderenza e poi la comunicazione reciproca. Tuttavia, l'esito di tali casi, sempre che l'animale colpito sopravviva, è quello di enteroanastomosi fistolose. Un'altra possibile origine di fusioni di tratti intestinali potrebbe forse essere individuata, sempre secondo Godlück (1967), nelle conseguenze di dislocazioni enteriche fetali. Escluse le suddette eventualità si deve pensare ad errori di sviluppo che si collocano nel periodo di formazione embrionale delle primitive anse intestinali ovvero nelle fasi di differenziazione del tenue e del grosso intestino (Joest, 1905; Godlück, 1967).

Il presente lavoro scaturisce dall'osservazione e dallo studio di un diverticolo intestinale da confluenza nel cavallo. L'osservazione è stata fatta in corso di esame necroscopico di un castrone baio di razza Trakehner, di 11 anni, impiegato nella disciplina del dressage. L'anamnesi remota del caso non è nota. Negli ultimi mesi di vita, il soggetto aveva presentato episodi colici ricorrenti, l'ultimo dei quali, particolarmente grave, consigliò il ricorso a laparotomia esplorativa e successivamente, vista l'estrema gravità della situazione clinica, indusse i chirurghi e la proprietaria a decidere per l'eutanasia. Nel corso della laparotomia esplorativa è stata rimossa un'ernia interna legamentosa costituita da anse digiunali che si erano impegnate in un non meglio definito "anello digiunale" dello stesso tenue.

### **Reperto macroscopico del caso in oggetto**

Buono stato di nutrizione. Alterazioni cadaveriche in atto. Ampia zona rasata della cute addominale sulla quale si rilevano gli esiti di tre incisioni chirurgiche longitudinali e press'a poco parallele tra loro, effettuate in tempi diversi e riconoscibili anche sulla parete muscolo-aponeurotica dell'addome:

1. una incisione di vecchia data posta anteriormente all'area ombelicale che, includendo una piccola ernia ventrale, corre lungo la linea alba per circa 10-12 cm e di cui non si distinguono bene le cicatrici dei punti;
2. un'altra, pure di vecchia data, posta a sinistra della precedente, della lunghezza di circa 22 cm ed attraversata dai segni appena visibili di 14 punti di sutura;
3. un'altra ancora, di data recentissima, posta a destra dell'ernia ventrale, lunga circa 20 cm, con bordi infiltrati di sangue e 10 punti di sutura in situ.

L'ernia ventrale mostra una "porta erniaria" di circa 5 cm di diametro, con sacco erniario appena accennato, ma senza contenuto erniario e priva di aderenze.

Sono altresì riconoscibili, nella regione scrotale, le due vecchie cicatrici da castrazione.

All'apertura della cavità addominale si nota un'intensa splenomegalia iperemica ed una moderata quantità di liquido sieroso-sanguinolento libero. Sono pure presenti aspetti di stasi ematica e fenomeni regressivi a carico del fegato e dei reni, in parte mascherati dalle alterazioni post-mortali. Nello stomaco, privo di contenuto alimentare ma alquanto dilatato, si rinvengono due ulcere lineari, relativamente recenti, poste ai lati della regione del fondo, insieme con numerose piccole erosioni

sparse anch'esse sulla mucosa gastrica ghiandolare. E' presente pure una gastrite catarrale cronica ipertrofica.

Lungo l'intestino tenue, a circa 6 m dal piloro, si nota una dilatazione di forma globosa allungata e di circa 20 x 10 x 10 cm, provvista di un lieve solco sagittale, derivante dall'apparente fusione di due tratti digiunali vicini e delimitante un ampio anello digiunale della lunghezza di circa 1,5 m (fig.1), la cui lamina mesenteriale risulta fenestrata al momento dell'estrazione dalla cavità addominale. Le pareti del suddetto anello, come pure quelle del digiuno afferente ed efferente, appaiono ispessite e discretamente contratte nei tratti di collegamento con il diverticolo.

All'apertura della dilatazione e di quasi tutto il digiuno si rileva abbondante contenuto fluido e torbido, di colore rosso scuro, e la mucosa sottostante appare infiammata con aspetti che variano dalla flogosi essudativa catarrale a quella emorragica. Le superfici dorsale e ventrale della dilatazione mostrano internamente un rilievo longitudinale, a guisa di rafe sagittale, che corrisponde al solco visibile esteriormente.

Il grosso intestino ed il retto evidenziano una discreta quantità di feci, ma non disturbi di circolo o flogosi di qualche gravità.

All'apertura della cavità toracica si nota edema polmonare da stasi e sfiancamento cardiaco totale con aspetti regressivi del miocardio. Alla radice dell'arteria mesenterica craniale sono presenti due placchette di ispessimento intinale in parte calcificate.

Nulla di particolare è rilevabile a carico degli altri organi toraco-addominali.

Per volontà della proprietaria del cavallo non si è proceduto alla dissezione di altre parti della carcassa.

L'esame istologico dei visceri è stato effettuato solo su fegato, reni, polmoni, e cuore. Dalla malformazione furono prelevati campioni di tratti intestinali afferente ed efferente, di concamerazione comune e dell'anello digiunale. Tutto il materiale suddetto è stato fissato in formalina al 10% ed incluso in paraffina. Le sezioni istologiche ottenute dai campioni così processati sono state colorate con Ematossilina-Eosina, Van Gieson, Mallory-Vannucci ed impregnazione argentea secondo Gomori.

## Reperto istologico del caso in oggetto

L'esame istologico del fegato evidenzia fenomeni di stasi ematica acuta e necrobiosi epatocitarie centro-lobulari su uno sfondo di rigonfiamento torbido diffuso del parenchima. I reni appaiono troppo cadaverici per consentire una precisa diagnosi istologica. Il polmone presenta intensa congestione ed edema. Il miocardio manifesta segni di rigonfiamento torbido delle fibre muscolari striate.

Il tratto del digiuno afferente alla malformazione presenta alterazioni cadaveriche avanzate soprattutto a carico della mucosa, lasciando comunque intravedere una lassa infiltrazione di cellule infiammatorie (granulociti eosinofili e qualche macrofago) nella lamina propria e nella sottomucosa. Il tratto prossimale dell'ansa digiunale evidenzia analoghe particolarità istologiche, ma con in più la comparsa di una intensa iperemia a livello di sottosierosa e strato esterno della tonaca muscolare. Il tratto distale dell'ansa digiunale mostra reperti analoghi a quelli del tratto precedente ulteriormente complicati da un intenso edema della sottomucosa. Il tratto efferente del digiuno, infine, manifesta alterazioni del tutto simili a quelle del primo tratto considerato.

Per quanto concerne le pareti della concamerazione comune, nell'angolo compreso fra i tratti afferente ed efferente del digiuno si distinguono, nelle sezioni colorate con Ematossilina-Eosina, i diversi strati della parete, così come figurano anche nelle pareti intestinali. Si possono pertanto individuare la mucosa, con lamina propria infiltrata da cellule infiammatorie (granulociti eosinofili e qualche macrofago), la muscularis mucosae; la sottomucosa, ancora più infiltrata da cellule infiammatorie dello stesso tipo; la muscolare, con i due strati (interno circolare ed esterno longitudinale) di spessore non inferiore a quelli normali e la sottosierosa, che è rappresentata soprattutto da tessuto connettivo fibroso piuttosto denso. La sezione del rafe sagittale evidenzia gli stessi strati, con la differenza che la tonaca muscolare appare interrotta per un tratto abbastanza ampio, che è tuttavia occupato, nella sua parte centrale, da un ammasso piuttosto disordinato di fibrocellule muscolari lisce, sfumante nel connettivo lasso circostante.

Nell'angolo compreso fra le 2 braccia dell'anello digiunale, le pareti della concamerazione rivelano reperti sostanzialmente sovrapponibili a quelli dell'angolo prossimale, con l'unica importante differenza che l'interruzione della tonaca muscolare, già notata a livello di rafe sagittale, è molto più stretta e manca

completamente della interposizione di un ammasso centrale di fibrocellule muscolari lisce. Va altresì sottolineato che il connettivo che unisce le due estremità dell'anello di tonaca muscolare risulta parimenti lasso ed anzi, verso la superficie sierosa, appare edematoso e quasi interamente percorso longitudinalmente da un'ampia lacuna linfatica.

Con le altre colorazioni (Van Gieson, Mallory e Gomori), si conferma la natura essenzialmente lassa del connettivo interposto sagittalmente fra le due estremità dell'anello interrotto di tonaca muscolare, in particolare per quanto concerne l'angolo distale.

### **Osservazioni conclusive**

I reperti anatomo patologici evidenziati a livello enterico, nel caso studiato, appaiono sovrapponibili alle rare descrizioni di diverticolo da confluenza reperibili in letteratura e limitate, per quanto emerge dalle nostre indagini bibliografiche, alla specie suina. I casi descritti nel passato da Joest (1905), Aser (1918) e Kitt (1923), casi che sono stati ripresi e discussi in epoca più recente da Godlück (1967), presentavano caratteristiche di maggior complessità, essendo per lo più derivanti dalla confluenza di almeno 3 anse di intestino tenue. Il caso capitato alla nostra osservazione è più semplice, risultando dalla fusione di 2 tratti digiunali vicini e provocando:

1. la delimitazione di un anello digiunale completo con lume beante,
2. la formazione, alla base dell'anello medesimo, di un unico ampio diverticolo a quattro aperture (duodeno afferente, i due bracci dell'anello, duodeno efferente), la cui origine dalla confluenza di 2 segmenti enterici contigui è dimostrata dall'esistenza di un appena accennato e regolare rafe sagittale.

Che si trattasse di una alterazione congenita e non di una possibile, remota patologia acquisita con successivi fenomeni di adattamento, nel senso ipotizzato da Kitt (1923) e Godlück (1967), è dimostrato dalle seguenti osservazioni:

- a) il diverticolo in questione è ampio, di forma globosa simmetrica e non presenta alcun carattere fistoloso, apparendo molto simile a quello documentato fotograficamente da Kitt (1923) in un suino;
- b) i segmenti enterici coinvolti sono invece piuttosto ristretti, come pure emerge nei casi di Joest e di Kitt;

- c) sul piano istologico, la tonaca muscolare del diverticolo mostra una struttura ed uno spessore non diversi da quelli dei segmenti enterici confluenti;
- d) la tonaca muscolare medesima, che deriva da quella dei due segmenti enterici confluenti, rivela, sempre all'esame istologico, una breve interruzione a livello del rafe sagittale, ov'è sostituita e saldata da tessuto connettivo di aspetto piuttosto lasso ed edematoso, includente in qualche sezione gruppi di fibrocellule muscolari lisce isolati e disorientati;
- e) la muscularis mucosae e la mucosa, per quanto alterate da fenomeni putrefattivi, presentano, anche a livello di rafe, una indiscutibile continuità.

Dal punto di vista delle conseguenze intravitali, è chiaro che il diverticolo in questione, pur provocando inevitabili alterazioni funzionali ed anatomo-patologiche (v. lesioni gastro-enteriche) dovute a rallentato flusso di materiale alimentare attraverso un percorso "vizioso" e con tratti enterici comunicanti piuttosto ristretti, non è risultato tuttavia incompatibile con uno sviluppo corporeo pressoché normale e con una pressochè normale espressione delle principali manifestazioni vitali, fatti salvi gli episodi colici ricorrenti segnalati nell'ultimo periodo della vita, che è, in pratica, l'unico periodo "non muto" della esistenza del soggetto. Questa osservazione non è in grave contrasto con l'affermazione di Godlück (1967) che, almeno nei suini da macello, "disturbi del funzionamento intestinale non sono stati osservati a seguito di diverticoli da confluenza". In realtà, nel caso equino da noi studiato, conseguenze cliniche ed alterazioni anatomo-patologiche ci sono state e non di lieve entità. Esse sono culminate nell'intervento chirurgico d'urgenza determinato dalla dislocazione di anse intestinali che si erano impegnate nell'anello digiunale e relativa membrana mesenteriale. D'altra parte, l'esistenza di altre 2 vecchie cicatrici laparotomiche sulla parete addominale del soggetto (una probabilmente dovuta a riduzione di un'ernia ventrale) fa pensare che, almeno in un'altra circostanza della sua vita, si sia reso necessario un intervento laparotomico verosimilmente non diverso da quello che ne ha causato indirettamente la morte.

A prescindere da queste considerazioni di ordine clinico e legale, meritava di essere segnalato - a nostro avviso - un tipo di diverticolo intestinale congenito, da confluenza di tratti vicini del tenue, che negli equini la trattatistica non ha ancora menzionato.

## **Bibliografia:**

- 1) Aser (1918) cit. da Godlück D. (1967).
- 2) Godlück D. - Mißbildungen des Darmes. In; Joest E. - Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere. 3te Auflage Parey Ver., Berlin u. Hamburg, 1967.
- 3) Hahn C. (1877) cit. da Godlück D. (1967).
- 4) Joest E. (1905) cit. da Godlück D. (1967).
- 5) Joest E. (1910) cit. da Godlück D. (1967).
- 6) Kitt Th. - Lehrbuch der pathologischen Anatomie der Haustiere. 5the Auflage. Enke Ver., Stuttgart, 1923.
- 7) Schmidt J. (1940) cit. da Godlück D. (1967).
- 8) Thieme E. (1955) cit. da Godlück D. (1967).

## **RIVELAZIONE IN SITU DI mRNA DI SERV (SHEEP ENDOGENOUS RETROVIRUS) SU TESSUTI DI FETO OVINO: RISULTATI PRELIMINARI**

Sanna E., Sanna M.P., Palmarini M.\*, Leoni A., Nieddu A.M, Sharp M.\*\*

*Settore di Patologia Generale e Anatomia Patologica Veterinaria - Università di Sassari - Italy*

*\*Irvine Cancer Center - California University - U.S.A.*

*\*\*Moredun Research Institute - Edinburgh - U.K.*

### **Introduzione**

Una delle caratteristiche più dibattute dell'Adenomatosi polmonare è costituita dalla sua presunta incapacità di indurre fenomeni immunitari e, in particolare, di stimolare la produzione di anticorpi circolanti. (1, 2). Tale fenomeno sarebbe imputabile all'interferenza immunologica fra l'agente causale, il Jaagsiekte Retro-virus (JSRV) con particolari sequenze endogene denominate, per analogia, Sheep Endogenous Retro-Virus (SERV); queste ultime, presenti in numero di 15-20 copie per genoma (3) sono state ritrovate in una larga varietà di tessuti, sia negli animali colpiti da Adenomatosi che in quelli sani. Il virus endogeno ha dimostrato di essere assai simile all'esogeno: le uniche differenze riguardano il tratto LTR e la risposta ad alcuni enzimi di restrizione nel gene Gag. La questione è indubbiamente complicata dalla possibilità che durante la malattia si stabilisca anche un meccanismo di immunodepressione analogo a quello osservato nel corso di infezioni da virus lenti; a parte le osservazioni sulla accresciuta suscettibilità alle polmoniti batteriche (4), vi è qualche evidenza sperimentale che negli animali colpiti si verifichi un decremento nel rapporto fra linfociti CD4+ e CD8+. Su sezioni di linfonodi mediastinici di ovini affetti da Adenomatosi polmonare, tale rapporto è infatti risultato di 0,44 in sede paracorticale e di 0,55 in sede midollare, a fronte del valore medio normale di 1-1,5 (5). L'osservazione è stata confermata anche con studi di citometria a flusso, nel corso dei quali le compagini CD4 e CD8+ si sono peraltro rivelate positive per DNA provirale di JSRV (6).

Appare comunque chiara, al di là dell'insorgenza di meccanismi immunodepressivi, l'importanza di una eventuale capacità trascrittiva di SERV durante la vita intrauterina: la sintesi di proteine JSRV-like potrebbe infatti interagire

negativamente con la produzione di risposte immunitarie nei confronti dell'agente eziologico dell'Adenomatosi polmonare.

Con l'obiettivo di chiarire questo particolare aspetto, abbiamo messo a punto una tecnica di ibridazione in situ atta a rivelare l'RNA di SERV su tessuti di feto e di placenta ovina e di ciò riferiremo nella presente nota.

### **Materiali e metodi**

Sono stati utilizzati tessuti di timo, linfonodi meseraici e polmoni di n. 2 feti ovini a termine e relative placenti. I campioni, prelevati sterilmente, venivano fissati in paraformaldeide al 4% per 23 ore e quindi inclusi in paraffina. Le sezioni, tagliate allo spessore di 6 $\mu$ , erano trattate allo scopo di preservare l'RNA e pertanto processate con materiali RNasi-"free"; a tale scopo le soluzioni venivano addizionate con DEPC (dietilpirocarbonato) allo 0,1%. I passaggi venivano eseguiti all'interno di un sistema "capillary gap" (Microprobe Biomeda). I campioni erano montati su vetrini speciali (Biomeda Microprobe Probe-On Plus) e, previo passaggio a 70°C per 10', sparaffinati in Xilolo/ Alcool assoluto e reidratati; essi venivano quindi trattati con HCl 0,2N per 15' (RT), Triton X-100 0,3% per 15' (RT), Protease K 5  $\mu$ g/ml x 5' a 37°C; dopo 3 lavaggi in PBS di 5', veniva effettuata una post-fissazione in paraformaldeide al 4% per 5' (RT). Dopo ulteriori lavaggi in PBS e in acqua sterile, le sezioni venivano trattate con una soluzione acquosa contenente TEA (trietanolamina) 0,1 M ed anidride acetica 0,25% per 10' (RT) e, quindi, ripetutamente lavate in PBS.

A questo punto, al fine di rimuovere il DNA presente nelle sezioni, queste erano incubate con una soluzione contenente 280  $\mu$ l di Dnasi "Rnasi-Free" 10U/ $\mu$ l in 780  $\mu$ l di tampone per Dnasi (20mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub> a pH 8 per 25' a 37°C; seguiva la denaturazione dell'enzima realizzata con lavaggi in PBS e passaggio a 80°C per 5'. Le sezioni venivano successivamente trattate con cocktail pre-ibridazione (2x SSPE/formamide 1:1) per 1 h a 37°C.

Come sonde rivelatrici dell'RNA di SERV venivano impiegate le seguenti sequenze oligonucleotidiche marcate con digoxigenina (Sarda Bioanalysis, Cagliari):

1) *endltr 428 AGCAAGAGTGCACCTGCACAGGGAAGAG*

2) *endltr 360 ATGGGGTTGAGAGGGATCAGCCCAAAT*

3) *endltr 152 GACAGGTTGCAGGAACTGGACATCTTGAAG*

4) *endltr 113* GATAAAATTCTTGAGGGGGGGCAGGACAGG

5) *endgag 91* CAATGCCTTGCATGTAGGAGGGTCCAATGTC

6) *endgag 160* TCTTGTTCCGGGCTTGCTGCTGGAAAAGTAC

Le sonde venivano diluite in buffer di ibridazione (1x Denhardtts, 5x SSPE, 0,1 mg/ml di DNA di sperma di salmone, 50% di formamide) fino ad una concentrazione di 0,5 ng/μl ciascuna. Il cocktail veniva diffuso attraverso gli spazi capillari dei vetrini e, a questo punto, si effettuava la denaturazione a 80°C per 3' seguita dall'ibridazione (overnight) a 37°C.

I lavaggi venivano condotti come segue: SSPE 6X/45% di formamide per 15' a 42°C x 2; SSPE 2X 5' (RT) x 2; SSPE 0,2X 5' a 50°C x 2; buffer 1 (0,1 M Tris, 0,15 M NaCl, pH 7,5) 1' (RT). La reazione proseguiva con il trattamento per 30' con una soluzione contenente 20 μl di Normal Rat Serum, 3 μl di Triton X-100 0,3% e Buffer 1 portato ad un ml totale; scopo di tale passaggio era quello di bloccare le fosfatasi alcaline endogene; seguivano quindi: antisiero anti-digoxigenina coniugato con fosfatasi alcalina per 2 h (RT) al buio (10,3 ml NRS, 3,1 μl Triton X-100 0,3%, 2 μl Anti-Dig/AP Boehringer, Buffer 1 portato a 1 ml), Buffer 1 per 15' (RT) x 2, Buffer 3 2' (RT) (0,1M Tris, 0,1 M NaCl, 0,05 M MgCl<sub>2</sub> pH 9,5). Veniva quindi eseguita, a 37°C x 5 ore, la rivelazione dell'attività enzimatica [soluzione contenente NBT/BCIP: 20 μl di stock solution (Kit Boehringer "Dig Nucleic Acid Detection"), 1 ml di Buffer 3]; i vetrini venivano infine lavati in acqua deionizzata, rimossi dal sistema per capillarità e montati in medium acquoso.

I medesimi campioni venivano inoltre trattati omettendo il passaggio in Dnasi.

Come controlli venivano infine utilizzati sicuri negativi (reni di coniglio).

Sezioni parallele di timo, linfonodi e polmoni fetali, oltrechè di placenti, venivano infine colorate con Ematossilina-Eosina per il controllo istologico.

## **Risultati**

I tests rivelavano segnali intracitoplasmatici in linfonodi mediastinici, timo e polmoni fetali, oltrechè in cellule dell'emiplacenta materna.

Nel feto, particolarmente interessante appariva il quadro osservato nel linfonodo: dopo trattamento Dnasico, si apprezzava infatti un consistente numero di segnali nella

midollare (foto n. 1), perlopiù localizzati nel citoplasma di linfociti di piccole e medie dimensioni (foto n. 2)

Per quanto riguarda il timo, le aree di positività si attestavano nella pars midollare dei lobuli (foto n. 3), coinvolgendo voluminosi elementi reticolo-epiteliali rigonfi oltrechè un limitato numero di linfociti (foto n. 4).

Il polmone, per contro, risultava pressochè negativo, eccezion fatta per qualche cellula epiteliale bronchiolare, che manifestava piccole marcature puntiformi intracitoplasmatiche (foto n. 5).

Riguardo alla placenta, nei cotiledoni si osservavano, dopo trattamento Dnasico, aree di positività a carico di cellule diverse (foto n. 6), con chiare zone di marcatura citoplasmatica nel sinciziotrofoblasto (foto n. 7), che confermavano anche in questo organo la presenza di RNA di SERV.

## **Discussione**

Alla luce dei risultati ottenuti, è possibile proporre alcune riflessioni, sia di metodo che di sostanza.

Dal punto di vista strettamente tecnico, la tecnica da noi prescelta presentava alcune difficoltà obiettive, derivanti soprattutto dalla necessità di conservare l'RNA target e di evitare ibridazioni con il DNA provirale integrato. Il primo aspetto veniva risolto con l'adozione di un protocollo mirato a preservare la sterilità dei campioni per tutta la durata della reazione e con l'impiego di materiali RNAsi-"free". L'uso della cappa a flusso laminare e di reagenti addizionati con DEPC (Dietilpirocarbonato) si dimostrava, in tal senso, irrinunciabile. Quanto alla "pulitura" del segnale da ibridi con il DNA, questa era realizzata in due modi: da un lato "forzando" la stringenza dei lavaggi, nella consapevolezza che gli ibridi RNA-DNA sono termicamente più stabili di quelli DNA-DNA; dall'altro procedendo a trattamenti con DNAsi prima dell'ibridazione. In teoria, si sarebbe potuta percorrere anche un'altra strada: quella di effettuare controlli "in negativo": o eliminando RNA presente con pre-trattamenti a base di RNAsi Dnasi "free", o demolendo gli ibridi marcati dopo l'ibridazione mediante RNAsi H. La procedura adottata, alla luce della esclusiva localizzazione intracitoplasmatica dei segnali, si è dimostrata tuttavia sufficientemente affidabile.

Quanto ai risultati ottenuti, essi rappresentano sicuramente una novità. Finora la comprensione dei meccanismi di infezione e diffusione della Adenomatosi polmonare

era stata affidata principalmente alle tecniche di PCR in fase liquida. Queste ultime, sebbene altamente sensibili e specifiche, non sono in grado di identificare SERV e JSRV nei tessuti, lasciando irrisolto il problema delle cellule permissive nei confronti dei due retrovirus. Ciò, va da sé, non consente di chiarire appieno la patogenesi della malattia. La tecnica da noi impiegata ha invece consentito di fare luce su un aspetto, a nostro avviso, di importanza cruciale: i citotipi interessanti dalla presenza di SERV durante la vita fetale. Si ricorderà come, nell'introduzione, si richiamasse la discordanza di opinioni presente nella comunità scientifica circa il ruolo e l'importanza delle sequenze endogene. La loro eventuale attività trascrizionale, ove presente durante la vita fetale, potrebbe in teoria indurre le difese a considerare "self" alcuni antigeni di provenienza esogena, con il risultato che l'animale adulto, quando colpito dalla malattia, non riuscirebbe a produrre una risposta immunitaria completa e/o efficace.

La nostra esperienza dimostra che nel feto ovino è in realtà presente RNA retrovirale endogeno. Quest'ultimo si attesta in organi, come il timo, assolutamente cruciali sul piano immunologico. Oltretutto, le sequenze di SERV risultano espresse da diverse cellule, quali i voluminosi elementi di probabile derivazione reticolo-epiteliale e i linfociti; questi ultimi, per quanto in misura limitata, sono positivi anche nei linfonodi; per contro, il segnale nei polmoni appare scarsissimo. Rimarchevole appare invece la marcatura riscontrata nel sincizio-trofoblasto.

In definitiva, sulla base dei risultati ottenuti, si può affermare che la presenza di attività trascrittive da parte di SERV durante la vita fetale risulta confermata. Le posizioni di coloro che invocano un'insufficienza di risposte immunitarie in corso di Adenomatosi, trovano in effetti conforto nei dati testè riportati. Naturalmente, prima di trarre conclusioni definitive, è necessario estendere le osservazioni a un numero più ampio di casi.

## **Bibliografia**

- 1) SHARP, J. M. & MARTIN, W. B.: "Chronic respiratory virus infections". In *Diseases of Sheep*, pp. I2-I7. Edited by W. B. Martin. Oxford: *Blackwell Scientific Publications*. 1983
- 2) VERWOERD, D. W.: "Jaagsiekte (ovine pulmonary adenomatosis) virus". In *Virus Infections of Ruminants*, pp. 453-463. Edited by Z. Dinter & B. Morein. New York: Elsevier Science Publishers, 1990

- 3) J. MIKE SHARP: "Contagious neoplasms of small ruminants: past, present and future issues", 3rd. European Workshop on Ovine and Caprine Retroviruses Jaca, Spain. 2nd-5th March, 1997.
- 4) ROSADIO, R. & SHARP, J. M.: "Leukocyte frequency alterations in sheep with naturally and experimentally induced lung cancer". *Medicina Veterinaria*, **9**, 49-51, 1992.
- 5) SANNA E. , MASALA G., LEONI A., NIEDDU A.M., PITTAU G., PORCU R.: "Linfoadenite mediastinica in corso di Adenomatosi Polomonare. Studio di Alcune sottopopolazioni linfocitarie ". *Atti S.I.S.Vet.*, **48**, 1019-1022, 1994.
- 6) HOLLAND M.J., PALMARINI M., DALZIEL R.G., SHARP M.: "Jaagsiekte sheep retrovirus proviral burden in lymphocyte subsets isolated from mediastinal lymph nodes of sheep affected by pulmonary adenomatosis", *Proc. 3<sup>rd</sup> European Workshop on Ovine and Caprine Retrovirus*, Jaca, Spain, 37,1997.

# **RUOLO DELL'IMMUNOISTOCHEMICA NELLA DIAGNOSI DELL'ENCEFALITE DA *LISTERIA MONOCYTOGENES* NEGLI OVI-CAPRINI**

Bozzetta E, Ligios C\*, Casalone C, Cottone E, Liciardi M\*, Lollai S\*, Caramelli M  
*Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Centro di  
Referenza Nazionale per le Encefalopatie animali e Neuropatologie comparate*  
*\*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna*

## **Introduzione**

L'attività di sorveglianza sulle Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili (EST) animali in Italia, ribadita ed ampliata dal D.M. 29/1/97 (G.U. n.ro 99 del 30/4/97), prevede tra l'altro la creazione di un registro nazionale delle neuropatologie animali, nell'ambito del quale emerge come *Listeria monocytogenes* rappresenti uno degli agenti eziologici più frequentemente coinvolti nelle sindromi neurologiche<sup>2</sup>. Lo stesso dato epidemiologico risulta peraltro dalle indagini svolte in altri paesi europei, quali Inghilterra e Svizzera<sup>9,5</sup>, ove si sottolinea l'importanza dell'ausilio di tecniche di laboratorio rapide e standardizzate per formulare una diagnosi eziologica di Listeriosi.

In molti casi, infatti, l'esame batteriologico non conferma il quadro istopatologico attribuibile a *Listeria monocytogenes*<sup>3</sup>; inoltre i dati anamnestici dell'animale giungono spesso al patologo incompleti, quando non addirittura assenti, non suggerendo quindi necessariamente la ricerca del germe; infine, non è da trascurare la possibilità che un eventuale trattamento terapeutico con antibiotici cui l'animale è stato sottoposto possa compromettere l'isolamento in coltura di *Listeria spp.*<sup>4</sup>

Nel nostro Paese le problematiche relative alla diagnostica differenziale delle EST negli ovi-caprini hanno reso il problema particolarmente rilevante, visti i recenti preoccupanti dati di incidenza della Scrapie in allevamenti del Centro-Sud e della Sardegna (Ru G., comunicazione personale). Peraltro, le caratteristiche dell'allevamento ovino (brado o semibrado) in Italia e a volte la reticenza dei pastori nel collaborare alle indagini sul campo, spesso non rendono disponibili eventuali dati clinici indicativi di *Listeria spp.*, quali decorso acuto, rialzo termico, atteggiamento di opistotono e di maneggio, che potrebbero far escludere un sospetto di encefalopatia spongiforme.

Accanto all'esame batteriologico, l'esame istopatologico ha da sempre rappresentato la metodica di laboratorio di ausilio nella diagnosi di encefalite da *L. monocytogenes*, poichè si riscontra un quadro istolesivo caratteristico ed indicativo della malattia<sup>8</sup>. Tuttavia la diagnosi definitiva richiede l'identificazione dell'agente eziologico.

A questo fine, nel presente studio, è stata valutata l'utilità della diagnosi immunoistochimica su encefali di ovini e caprini con lesioni istologiche riferibili a *L. monocytogenes*, correlandole, ove disponibile, con l'esame batteriologico; è inoltre stata valutata l'efficacia di alcuni trattamenti di smascheramento antigenico, già risultati efficaci nell'aumentare la sensibilità della tecnica quando applicati nella identificazione di altri antigeni localizzati a livello encefalico<sup>1</sup>.

### **Materiali e metodi**

Nel periodo 1992-1998, nei nostri Istituti sono stati sottoposti ad esame anatomicopatologico 8 ovini e 7 caprini di età compresa tra i 15 giorni ed i 2 anni; gli ovini erano di razza biellese, sarda o meticcica, mentre le capre erano di razza alpina o meticcica. Clinicamente, essi avevano presentato sintomatologia nervosa a decorso acuto, con emi-paralisi dei muscoli facciali, movimenti di maneggio e rialzo termico; tale quadro aveva permesso di porre il sospetto di Listeriosi.

*Esame batteriologico.* Sui 15 soggetti dei quali era disponibile tessuto nervoso fresco, è stata prelevata in condizioni di sterilità una porzione di parenchima dall'ultimo tratto del midollo allungato, la quale è stata messa ad incubare in un brodo di arricchimento (*Listeria Enrichment Broth - BBL*) a 37°C per 24 ore, dopo di che si è eseguito un trapianto in agar selettivo (*Listeria Selective Agar - Oxford Formulation - Oxoid*), a sua volta incubato a 37°C per altre 24 ore.

Le colonie sospette sono state identificate come *Listeria monocytogenes*, mediante colorazione di Gram e prove biochimiche con metodo di identificazione rapida API *Listeria* (Bio-Mérieux).

I ceppi di *L. monocytogenes* isolati presso l'Istituto Zooprofilattico della Sardegna, relativi a 5 ovini e 2 caprini, sono inoltre stati sierotipizzati mediante prova di agglutinazione su vetrino con sieri specifici (DIFCO) anti-sierotipo 1 e anti-sierotipo 4, riconosciuti come i più diffusi sia in medicina veterinaria che in umana<sup>8</sup>.

*Esame istologico.* Le sezioni di encefalo incluse in paraffina, a carico delle quali si apprezzavano lesioni riferibili a Listeriosi, sono state sottoposte a esame immunostochimico utilizzando come anticorpo primario un siero policlonale anti-*L. monocytogenes* (Listeria O antisera types 1,4 and poly, DIFCO) diluito 1:250. Per la rivelazione è stato utilizzato il kit LSAB-perossidasi (DAKO) e come cromogeni il 3-amino-9-etilcarbazolo (AEC) oppure la 3-3'-diaminobenzidina (DAB). È stato utilizzato quale controllo positivo un campione di encefalo di capra già risultato positivo agli esami istologico, batteriologico ed immunostochimico; quali controlli negativi sono stati utilizzati 4 encefali (2 di ovino e 2 di caprino) clinicamente sani.

Un siero non immune di coniglio è stato inoltre impiegato in luogo dell'anticorpo primario su sezioni di ciascun campione, al fine di valutare le eventuali colorazioni aspecifiche.

Sui campioni positivi all'esame batteriologico, è stato eseguito l'esame immunostochimico sia senza smascheramento antigenico, sia con l'adozione di due diverse tecniche di ripristino dell'antigenicità: la prima prevede il trattamento in autoclave (121°C per 10 minuti) e l'altra in forno a microonde (2 cicli da 5 minuti ognuno, alla potenza di 850 W); in entrambi i casi le sezioni istologiche venivano immerse in tampone citrato 10 mM, pH 6.

Su 2 encefali di ovino e 1 di caprino pervenuti già fissati al laboratorio, su cui non era possibile effettuare la ricerca batteriologica colturale, sono stati eseguiti gli esami istologico ed immunostochimico.

## **Risultati**

All'esame batteriologico sono risultati positivi per *Listeria monocytogenes* 6 ovini e 5 caprini, mentre 2 caprini e 2 ovini risultavano negativi. I ceppi isolati nei 7 casi verificatisi in Sardegna sono risultati appartenere al sierotipo 1.

Istologicamente, in tutti i campioni le aree encefaliche interessate erano localizzate lungo tutto il tronco encefalico caudale, in particolare nel midollo allungato, ma in qualche caso le lesioni erano evidenti anche nel mesencefalo, nel cervelletto e nel midollo spinale a livello della fuoriuscita del primo nervo cervicale; le lesioni consistevano in manicotti perivascolari mononucleari, formazioni microascessuali, aree malaciche, noduli gliali e neuronofagia; nella maggior parte dei

casi questi aspetti istolesivi avevano una distribuzione monolaterale. Era inoltre possibile osservare leptomeningite non purulenta di tipo linfocitario.

All'esame immunoistochimico la visualizzazione di *L. monocytogenes* è stata possibile in tutti i campioni di encefalo risultati positivi all'esame batteriologico; in 1 caso, tuttavia, la positività è stata rilevata solo grazie all'adozione dei trattamenti di ripristino dell'antigenicità. I 4 campioni negativi all'esame colturale sono risultati positivi. Degli encefali di cui era disponibile solo il tessuto in paraffina, solo 1 ovino risultava negativo.

In 9 campioni, l'immunolocalizzazione appariva diffusa a tutto il tronco encefalico, mentre nei rimanenti era localizzata ora a livello del midollo spinale, ora del midollo allungato. Positività è stata rilevata anche a livello del mesencefalo ma non nel cervelletto, in un caso che presentava lesioni in questa sede.

In genere l'immunopositività era direttamente proporzionale all'estensione delle alterazioni necrotiche ed era evidenziabile all'interno del citoplasma di macrofagi e polimorfonucleati neutrofili, in forma di masserelle intensamente colorate. Inoltre, nei casi di più intensa positività e gravità del quadro istolesivo, non era raro il riscontro, a livello del neuropilo, sia di caratteristiche colonie batteriche, sia di elementi batterici singoli o duplici disposti a V, spiccatamente positivi.

Raro era il riscontro di positività antigenica in posizione intra-neuronale e perivasale, presente comunque solo nei casi in cui le lesioni istologiche risultavano molto gravi e l'immunopositività evidente nelle altre sedi.

Per quanto riguarda le tecniche di ripristino dell'antigenicità cui sono stati sottoposti i campioni, i metodi utilizzati hanno mostrato una analoga sensibilità. Inoltre, se il trattamento in autoclave sembra determinare un aumento di intensità del segnale, l'uso del forno a microonde risulta più pratico e standardizzabile.

## **Discussione**

Dall'analisi dei nostri risultati emerge che l'esame immunoistochimico eseguito con l'utilizzo di una tecnica di ripristino dell'antigenicità ha permesso di confermare la positività batteriologica in tutti i casi, risultando più affidabile dal punto di vista diagnostico rispetto a quanto rilevato da Gayle e coll.<sup>3</sup>, il quale tuttavia non ricorreva all'utilizzo di tecniche di smascheramento antigenico. E' inoltre importante sottolineare che nei nostri casi si è riscontrata positività immunoistochimica in tutti gli

encefali che presentavano lesioni istologiche indicative di Listeriosi, mentre l'esame batteriologico è risultato positivo solo in 11 dei 15 casi in cui è stato allestito. A questo riguardo riteniamo che, in almeno 2 dei casi considerati, il ricorso a tentativi terapeutici a base di antibiotici sugli animali in vita, come risulta dalla scheda anamnestica, abbia inficiato il tentativo d'isolamento del germe.

Per quanto riguarda le tecniche di ripristino dell'antigenicità, l'impiego del forno a microonde o dell'autoclave risulta preferibile rispetto ad altre tecniche sia per la semplicità d'uso, che per l'economicità dei reattivi e degli strumenti impiegati, nonché per la possibilità di standardizzare i protocolli<sup>6,7</sup>. I trattamenti da noi applicati hanno permesso sia di aumentare la sensibilità della tecnica immunoistochimica (100% rispetto al 90,9%), sia di individuare positività a carico di corpi batterici non altrimenti rivelati nella stessa area, permettendo così un accertamento più sicuro della presenza di *L. monocytogenes*. Ricordiamo in proposito che tecniche di colorazione quali la Gram, già adottata da altri Autori<sup>3</sup>, rendono più difficile l'identificazione dei singoli batteri; inoltre, solo la colorazione immunoistochimica permette di rilevare le positività antigeniche intracellulari.

Infine, nei campioni di archivio di casi istologici e di encefali pervenuti già fissati in formalina, solo mediante l'esame immunoistochimico è stata possibile la conferma del sospetto istologico (nel nostro caso in 2 dei campioni testati).

L'applicazione di anticorpi anti-*Listeria monocytogenes* su sezioni istologiche può risultare quindi di grande utilità per la conferma eziologica di quadri istolesivi indicativi di Listeriosi e deve essere presa in considerazione quale tecnica da adottare nella prassi diagnostica di laboratorio.

L'apporto tecnico del presente lavoro è da attribuire alla Sig.na Sara Baracco e al Sig. Carlo Arru, Operatori Professionali di I categoria, Tecnici di laboratorio.

## **Bibliografia**

- 1) Bankfalvi A, Navabi H, Bier B, Böcker W, Jasani B & Schmid KW: Wet autoclave pretreatment for antigen retrieval in diagnostic immunohistochemistry. *J Pathol*, **174**: 223-228, 1994.
- 2) Bozzetta E, Casalone C, Meineri V, Di Guardo G, Eleni C, Ligios C, Ru G, Capucchio MT, Guarda F, Agrimi U, Caramelli M: Neuropathological findings in sheep and goat

- during a 2 years survey on Scrapie in Italy. Abstract 15<sup>th</sup> meeting of ESVP., Sassari-Alghero, 16-19 september, 24, 1997.
- 3) Gayle GC, Fales WH, Maddox CW, Ramos-Vara JA: Evaluation of laboratory tests for confirming the diagnosis of encephalitic listeriosis in ruminants. *J. Vet Diagn Invest* **7**:223-228, 1995.
  - 4) Gualandi G: *Listeria*. In: Trattato di malattie infettive degli animali, eds. Farina R, Scatozza F, pp 319-326. UTET, Torino, 1995.
  - 5) Heim D, Fatzer A, Hörnlimann B & Vandevelde M: Frequency of neurological diseases in cattle. *Schweiz Arch Tierheilk*, **139**: 354-362, 1997.
  - 6) Shi SR, Key ME, Kalra KL: Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem* **39**: 741-48, 1991.
  - 7) Shin RW, Iwaki T, Kitamoto T, Tateishi J: Hydrated autoclave pretreatment enhances TAU immunoreactivity in formalin-fixed normal Alzheimer's disease brain tissue. *Lab Inv* **64**: 693-702, 1994.
  - 8) Weinstock D, Horton SB, Rowland PH: Rapid diagnosis of *Listeria monocytogenes* by immunohistochemistry in formalin-fixed brain tissue. *Vet Pathol*, **32**: 193-195, 1995.
  - 9) Wells GAH, Sayers AR, Wilesmith JW: Clinical and epidemiological correlates of the neurohistology of cases of histologically unconfirmed, clinically suspected bovine spongiform encephalopathy. *Vet Rec* **4**: 211-215, 1994.

# **EVIDENZIAMENTO DELLA PROTEINA PRIONICA NELLA SCRAPIE DELLE CAPRE**

N.Pozzato, M.T. Capucchio, V. Di Marco<sup>1</sup>, F. Montesi<sup>2</sup>, F. Guarda e B. Biolatti<sup>3</sup>  
*Università di Torino; Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia; Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie; Università di Padova*

## **Introduzione**

La scrapie è storicamente una patologia progressiva ad andamento subacuto-cronico ed inesorabilmente fatale che colpisce le pecore e le capre. In realtà i caprini sono generalmente refrattari alla malattia e solo occasionalmente ne vengono colpiti. In Italia, però, abbiamo notato negli ultimi due anni un notevole incremento di questi casi, fatto abbastanza singolare, forse dovuto a una maggior sensibilizzazione sulle patologie da prioni avvenuta in seguito allo scoppio della bomba BSE. Questo ci ha spinti a sperimentare sulla specie caprina i metodi diagnostici abitualmente utilizzati nello studio delle altre encefalopatie spongiformi trasmissibili: lo studio istopatologico ed immunoistochimico del sistema nervoso centrale, la determinazione della presenza di SAF (fibrille associate alla scrapie) e la tecnica di western blot.

## **Materiali e metodi**

Sono stati raccolti campioni di midollo allungato da capre di età compresa tra i 2 e i 4 anni con sintomatologia nervosa ascrivibile a scrapie. Una porzione è stata congelata a -80°C ed il resto fissato in formalina tamponata al 10% e ed incluso in paraffina per effettuare lo studio istopatologico ed immunoistochimico secondo il protocollo di Capucchio et al.(1).

500 mg di tessuto congelato sono stati processati per la purificazione della PrP<sup>Sc</sup> secondo il protocollo di Hilmert e Diringer modificato (2) e successiva evidenziazione delle SAF mediante M.E. a 35-40000x. Alcuni campioni sono pure stati sottoposti al Western Blot previa purificazione mediante la tecnica di Beekes et al.(3) modificata. Per questo studio sono stati utilizzati anticorpi policlonali anti-PrP bovina ricombinante.

## **Risultati e discussione**

Per quanto riguarda la sintomatologia clinica, gli animali studiati presentavano sintomi ascrivibili alla scrapie: prurito più o meno intenso, presenza di aree alopeciche ed erosioni lungo la linea del dorso e sulla regione della groppa, tremori muscolari ed incoordinazione dei movimenti.

Lo studio istologico ha dimostrato la presenza di lesioni di tipo spongiforme caratterizzate da non frequenti vacuolizzazioni intraneuronali, lieve spongiosi, astrocitosi e gliosi. Allo studio immunostochimico è stata dimostrata la presenza di modiche quantità di PrP<sup>Sc</sup> dopo trattamento del tessuto con autoclave e proteinasi K. La ricerca delle SAF ha dimostrato la presenza di fibrille simili a quelle dimostrate nella specie ovina e bovina anche se in minore quantità. Lo studio mediante western blot ha dimostrato la presenza, dopo purificazione e trattamento con proteinasi K, delle caratteristiche tre bande di cui la maggiore di circa 27 KDaltons. Questo studio preliminare dimostra che nella scrapie caprina si possono applicare le metodiche utilizzate nella diagnosi delle altre encefalopatie spongiformi. Ulteriori studi saranno comunque necessari per comparare le varie tecniche messe a punto in modo da definire la sensibilità delle stesse nella diagnosi di questa patologia.

## **Bibliografia**

- 1) CAPUCCHIO M.T., GUARDA F., ISAIA M.C., CARACAPPA S., DI MARCO V.  
“Natural occurrence of scrapie in goats in Italy” (1998) Vet Rec in press
- 2) POZZATO N., DE LAS HERAS M., y GARCIA DE JALÓN J.A. "Diagnostico del scrapie mediante identificacion de fibrillas asociadas al Scrapie (SAF)" (1996) Med Vet 13: 345-348
- 3) BEEKES M., BALDHAUF E., CASSENS S., DIRINGER H., KEYES P., SCOTT A.C., WELLS G.A.H., BROWN P., GIBBS C.J. and GAJDUSEK D.C. “ Western blot mapping of disease specific amyloid in various animals species and humans with trasmissible spongiform encephalopathies using a high yield purification method” (1995) J Gen Vir 76, 10: 2567-2576

# **FUNZIONALITÀ GRANULOCITARIA NEL BOVINO: OSSERVAZIONI "IN VITRO" IN PRESENZA DI DUE CONCENTRAZIONI DI CORPI CHETONICI**

Comazzi S., Paltrinieri S., Sartorelli P., Agnes F.  
*Istituto di Patologia Generale Veterinaria, Milano*

## **Introduzione**

Gli stati chetotici nei ruminanti sembrano causare una depressione delle difese specifiche e aspecifiche dell'organismo: nel bovino sono state segnalate, "in vitro", alterazioni funzionali sia dei linfociti T (Klucinsky et al., 1988-a), sia dei macrofagi e neutrofili (PMN) del latte (Klucinsky et al., 1988-b). Precedenti indagini condotte su granulociti ovini avevano rilevato alcune alterazioni della fagocitosi e della chemiotassi in presenza di corpi chetonici (Paltrinieri et al., 1996). Alla luce del fatto che i PMN bovini presentano alcune peculiarità metaboliche rispetto a quelli ovini (Sartorelli e Paltrinieri, 1991) si è voluto valutare l'effetto esercitato "in vitro" dai corpi chetonici sui PMN bovini.

## **Materiali e Metodi**

L'indagine è stata condotta su 32 bovine da latte di razza Frisona italiana, clinicamente sane, non gravide, appartenenti allo stesso allevamento e quindi sottoposte al medesimo regime alimentare. I PMN sono stati isolati con il metodo descritto da Carlson e Kaneko (1973), che prevede la separazione dei neutrofili per centrifugazione e successiva lisi osmotica degli eritrociti. Dopo valutazione della vitalità mediante metodo di esclusione del Trypan blu si è proceduto alle prove funzionali sia in condizioni basali che in presenza di 2,4 mmol/l o 4,8 mmol/l di acetoacetato e  $\beta$ -OH-butirrato da soli o in associazione. Inoltre, poiché è stato utilizzato acetoacetato sotto forma di sale di litio, composto che può esercitare effetti immunomodulatori (Franklin et al., 1991) è stata saggiata anche l'influenza del cloruro di litio (LiCl) alle stesse concentrazioni.

La chemiotassi è stata valutata in camere a 12 pozzetti (Neuroprobe) utilizzando come attivatore siero omologo, attivato con zymosan, al 50% in Hanks (Boyden, 1962).

Per valutare la capacità di inglobamento sono state utilizzate particelle di lattice di polistirene (1,09  $\mu\text{m}$ , 20 particelle/PMN) con dosaggio spettrofotometrico della quantità di lattice ingerita, dopo solubilizzazione in diossano (Kvarstein, 1969).

L'aderenza e la produzione di anione superossido sono state valutate simultaneamente in micropiastre a 96 pozzetti secondo il metodo descritto da Bellavite et al. (1992). Alcuni pozzetti sono state preincubati con gelatina (5mg/ml PBS) al fine di evitare attivazioni aspecifiche. In altri pozzetti questa procedura è stata, invece, omessa per valutare l'attivazione aspecifica da contatto con la plastica. Come attivatore specifico è stato utilizzato PMA alla concentrazione finale di  $10^{-7}$  mol/l. Ogni prova è stata valutata in quadruplo. Per l'analisi statistica è stato utilizzato il software SPSS 6.1.2.

## Risultati

I risultati relativi a vitalità, purezza e recupero della popolazione isolata sono riportati in tabella 1.

Vitalità %	Purezza %			Recupero %
	Neutrofili	Eosinofili	Mononucleati	
97,3 $\pm 0,8$	74,6 $\pm 13,3$	9,1 $\pm 9,4$	16,3 $\pm 11,5$	47,2 $\pm 22,0$

Tabella 1: Valori medi ( $\pm$  D.S.) relativi a vitalità, purezza e recupero della popolazione cellulare isolata

La quantità di leucociti isolata è risultata strettamente correlata a quella nel sangue di partenza ( $P < 0,001$ ,  $r = 0,74$ ).

I risultati riguardanti l'effetto esercitato da 2,4 e 4,8 mmol/l di corpi chetonici e di LiCl sulla chemiotassi e le relative analisi statistiche sono riportati in tabella 2.

	Basale	Attivato	Attivato +A	Attivato +B	Attivato +A+B	Attiv. + LiCl
2,4 mmol/l	38 $\pm$ 8,3	105 $\pm$ 26,5 ###	96 $\pm$ 28,6 n.s.	98 $\pm$ 30,7 n.s.	93 $\pm$ 30,1 n.s.	99 $\pm$ 31,2 n.s.
4,8 mmol/l	48 $\pm$ 10,5	131 $\pm$ 18,7 ###	125 $\pm$ 21,3 *	127 $\pm$ 18,6 n.s.	120 $\pm$ 24,1 *	123 $\pm$ 22,1 *

Tabella 2: valori medi ( $\pm$  D.S.) relativi alle distanze in  $\mu\text{m}$  percorse dai neutrofili nelle prove eseguite in presenza di 2,4 e 4,8 mmol/l di corpi chetonici o cloruro di litio. Legenda:### =  $P < 0,001$  vs basale; \* =  $P < 0,05$  vs attivato; ns = non significativo vs attivato, A = Acetoacetato, B =  $\beta$ -OH-Butirrato

I risultati delle prove di inglobamento non hanno mostrato differenze statisticamente significative né dopo aggiunta dei corpi chetonici, da soli o in associazione, né dopo aggiunta di LiCl.

Analogamente né i corpi chetonici né il LiCl hanno influenzato l'aderenza. Per quanto riguarda invece l'effetto dei diversi tipi di attivazione sono stati riscontrati valori di aderenza statisticamente superiori rispetto a quella basale dopo stimolazione aspecifica ( $P < 0,001$ ); l'aggiunta di PMA ha determinato un notevole incremento della capacità adesiva sia rispetto ai valori basali ( $P < 0,001$ ), sia rispetto a quelli ottenuti con la sola stimolazione aspecifica ( $P < 0,05$ ). L'aderenza non è stata ulteriormente stimolata quando i due tipi di attivazione sono stati concomitanti.

La produzione di anione superossido basale e dopo stimolazione aspecifica è risultata nel bovino praticamente nulla, mentre il PMA si è dimostrato un potente attivatore ( $P < 0,001$  vs basale,  $P < 0,001$  vs aspecifica). Nei campioni incubati con PMA si è riscontrato un effetto inibitore dell'acetoacetato, a concentrazioni di 2,4 mmol/l, ( $P < 0,01$ ) e attivatore in presenza di cloruro di litio ( $P < 0,01$ ); nei pozzetti sottoposti ad attivazione mista tutti i corpi chetonici ed il cloruro di litio hanno determinato una riduzione della produzione di anione superossido ( $P < 0,001$ ). A concentrazioni più elevate di corpi chetonici (4,8 mmol/l) non sono state rilevate influenze significative.

## **Discussione**

La metodica di isolamento utilizzata ha fornito una popolazione cellulare sostanzialmente idonea allo studio della funzionalità granulocitaria "in vitro". La percentuale di PMN isolata è risultata sufficientemente elevata da consentire una corretta valutazione delle prove funzionali eseguite. La contaminazione di monociti ed eosinofili, che potrebbe, in varia misura, interferire con le prove funzionali effettuate è risultata abbastanza contenuta.

Le prove di chemiotassi hanno confermato come il siero attivato con zymosan rappresenti un ottimo attivatore nella specie bovina (Sartorelli et al., 1990; Zwahlen a Roth, 1990) addirittura più potente che nella pecora (Paltrinieri et al., 1996).

L'analisi dei risultati della chemiotassi mette in evidenza come l'attività chemiotattica dei PMN bovini sia inibita solamente da concentrazioni elevate di corpi chetonici (4,8 mmol/l) di acetoacetato sia da solo ( $P < 0,05$ ) che associato al  $\beta$ -OH-butirrato ( $P < 0,05$ ), ma non dal solo  $\beta$ -OH-butirrato. Ciò potrebbe essere imputabile, più che ad un'azione

diretta dell'acetoacetato, all'influenza del litio, dal momento che il cloruro di litio ha esercitato anch'esso un'azione inibente la chemiotassi ( $P < 0,05$ ). Da notare inoltre è la differenza rispetto alla specie ovina nella quale già a ridotte concentrazioni di  $\beta$ -OH-butirrato (2,4 mmol/l) la chemiotassi risultava inibita (Lucchini, 1997).

I risultati delle prove di inglobamento e aderenza evidenziano una elevatissima variabilità individuale che non permette di trarre considerazioni riguardo l'influenza dei corpi chetonici su queste tappe della fagocitosi.

In tale ottica vanno interpretati probabilmente anche i discordanti risultati sulla produzione di anione superossido, in accordo con recenti studi che non evidenziano influenze da parte del  $\beta$ -OH-butirrato a dosi subchetotiche (Hoeben et al., 1997)

Rimangono comunque da sottolineare la scarsissima produzione di anione superossido in condizioni basali, già segnalata in letteratura nei ruminanti (Guelfi e Courdouhji, 1987), nonché il potente effetto attivatore indotto su questo parametro e sull'aderenza dal PMA e sulla aderenza anche solo dal semplice contatto con la plastica, che fanno ritenere sostanzialmente idonee alla specie bovina le metodiche da noi utilizzate.

In definitiva sembra di poter concludere che solo la chemiotassi potrebbe essere influenzata dalla presenza di corpi chetonici, peraltro a concentrazioni molto elevate, nonostante la simultanea depressione indotta dal cloruro di litio ci induca a ritenere il litio come probabile responsabile di tale fenomeno. Va altresì ricordato che "in vivo" la chemiotassi rappresenta una delle prime tappe dell'intero processo fagocitario, ed un suo deficit potrebbe condizionare l'integrità delle capacità difensive degli animali chetosici.

I neutrofili bovini sembrano differire da quelli di pecora nella risposta a stimoli attivatori in presenza di corpi chetonici. In particolare, mentre nella pecora la presenza di corpi chetonici sembra indurre notevoli modificazioni nella chemiotassi sia a concentrazioni medie che a concentrazioni superiori ed interferisce anche nella fagocitosi, nel bovino tali influenze non sono riscontrabili. Ciò potrebbe essere imputabile a particolarità intrinseche delle cellule bovine, che già erano emerse in altri lavori, per quanto riguarda il metabolismo energetico rispetto a PMN umani (Sartorelli et al., 1990) e ovini (Sartorelli e Paltrinieri, 1991). L'ampiamiento della casistica, accanto ad una maggiore standardizzazione dei soggetti, potrebbe consentire di ridurre l'elevata variabilità riscontrata e di definire se il pannello di test da noi

messo a punto nella pecora sia realmente adatto alla valutazione della funzionalità granulocitaria nel bovino.

## **Bibliografia**

- 1) Bellavite P., Chirumbolo S., Mansoldo C., Gandini G., Dri P.: Simultaneous assay for oxidative metabolism and adhesion of human neutrophils: evidence for correlations and dissociations of the two responses. *Journal of leukocyte biology*. **51**, 329-335, 1992
- 2) Boyden S.: Chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. *J.Exp.Med.*, **115**, 453-466, 1962.
- 3) Carlson G.P., Kaneko J.J.: Isolation of leukocytes from bovine peripheral blood. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.*, **142**, 853-856, 1973.
- 4) Franklin S.T., Young J.W., Nonnecke B.J.: Effects of ketones, acetate, butyrate, and glucose on bovine lymphocyte proliferation. *J.Dairy Sci.*, **74**, 2507-2514, 1991.
- 5) Guelfi J.F., Courdouhji M.K.: Exploration de quelques fonctions des polynucleaires neutrophiles sanguins du mouton. *Ev.Med.Vet.*, **138**, 995-998, 1987.
- 6) Hoeben D., Heyneman R., Burvenich C.: Elevated levels of  $\beta$ -Hydroxybutiric acid in periparturient cows and in vitro effect on respiratory burst activity of bovine neutrophils. *Vet. Immunol.Immunopathol.*, **58**, 165-170, 1997
- 7) Klucinski W., Miernik-Degorska E., Degoski A., Targowski S., Winnicka A.: Effect of ketone bodies on the mitogenic response of bovine milk lymphocytes. *J.Vet.Med.A*, **35**, 626-631, 1988-a
- 8) Klucinski W., Degorski A., Miernik-Degorska E., Targowski S., Winnicka A.: Effect of ketone bodies on the phagocytic activity of bovine milk macrophages and polymorphonuclear leukocytes. *J.Vet.Med.A*, **35**, 632-639, 1988-b.
- 9) Kvarstein B.: The effect of temperature, metabolic inhibitors, and EDTA on phagocytosis of polystyrene latex particles by human leukocytes. *Scand. J.Clin.Lab.Invest.*, **24**, 271-277, 1969.
- 10) Lucchini D.: Effetto "in vitro" di due concentrazioni di corpi chetonici sulla funzionalità dei granulociti neutrofilici di pecora. Tesi di laurea in Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Milano, AA 1996.97.
- 11) Paltrinieri S., Sartorelli P., Agnes F.: In vitro effects of ketone bodies on sheep neutrophil functions. *Eur.J.Haematol.(suppl.96)*, **57**, 18, 1996
- 12) Sartorelli P., Pizzoli R., Dominoni S.: Valutazione "in vitro" dell'attività fagocitaria dei granulociti neutrofilici di bovino. *Atti S.I.S.Vet.*, **44**, 397-399, 1990
- 13) Sartorelli P., Paltrinieri S.: Attività fagocitaria "in vitro" di granulociti neutrofilici di pecora. *Atti S.I.S. Vet.* **45**, 1065-1067, 1991

14) Zwahlen D.R., Roth D.R.: Chemotactic competence of neutrophils from neonatal calves.  
*Inflammation*. **14**, 109-123, 1990.

RICERCA ESEGUITA CON CONTRIBUTO M.U.R.S.T. EX 40%

# MASTITE DA *MYCOPLASMA AGALACTIAE*: INDAGINI EZIOLOGICHE E QUADRO ISTOPATOLOGICO DELL'INFEZIONE - NOTA PRELIMINARE

G.R. Loria\*, C. Sammartino\*, C. Piraino, R.A.J. Nicholas\*\*, S. Caracappa\*

\*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri"- Palermo

\*\*Central Veterinary Laboratory-Addlestone- UK

## Riassunto

Dopo una disamina sui danni causati dall' Agalassia contagiosa alla produzione lattiero casearia siciliana, gli Autori riportano i dati preliminari di una indagine eziologica su n° 120 stipti di Mycoplasma isolati da latti di massa durante l'attività diagnostica svolta nel corso degli ultimi sette anni nella Regione. I ceppi isolati sono stati liofilizzati e secondariamente caratterizzati tramite prove biochimiche convenzionali e metodi di biologia molecolare (PCR). Il 98.4% dei Mycoplasmi è risultato appartenere alla specie *M. agalactiae*.

Vengono riferiti alcuni quadri istopatologici di mastite interstiziale cronica di tipo linfo-plasmacellulare da mammelle infette da *M. agalactiae*.

## Obbiettivi

- Raccogliere informazioni riguardo l'eziologia della mastite in corso di Agalassia contagiosa in Sicilia
- Valutare la sensibilità e la specificità dei metodi di identificazione in uso nei nostri laboratori
- Valutare gli aspetti istopatologici in mammelle ovine con lesioni specifiche da *M. agalactiae*

## Introduzione

L'Agalassia contagiosa è responsabile di oltre il 40% delle infezioni mammarie degli ovi-caprini in Sicilia, tale malattia si pone prioritariamente tra le emergenze sanitarie zootecniche regionali seconda soltanto alla Brucellosi. Tale infezione infatti, per la drastica interruzione della lattazione nel gregge con crollo della produzione

stagionale, per le conseguenti implicazioni che derivano dalla denuncia del focolaio, per le attuali difficoltà nell'estinguere il focolaio con la terapia e/o vaccini penalizza drammaticamente l'attività produttiva stagionale.

Nella Nostra Regione la malattia è endemica da decenni, i fattori di rischio che ne determinano la diffusione sono correlati alle peculiarità caratteristiche dell'allevamento ovi-caprino che è ancora legato a tipologie pastorali tipicamente mediterranee: la conduzione di tipo estensivo dell'azienda, il pascolo promiscuo, la presenza di razze a prevalente attitudine latte, la selezione zootecnica rivolta principalmente alla produzione casearia con lattazioni prolungate rispetto ad altre regioni italiane, la mungitura effettuata prevalentemente a mano, la presenza di caprini che spesso fungono da portatori sani dell'infezione nonché i commerci e gli scambi frequenti ed incontrollati di animali, sono infatti tutti elementi che rendono particolarmente vulnerabile/suscettibile la zootecnia siciliana.

La mastite in corso di *Agalassia contagiosa* è causata dalla localizzazione mammaria del *Mycoplasma* che rappresenta uno degli apparati bersaglio dell'infezione (mammella, occhio, articolazioni, utero) e non, come in altre mastiti, come lesione idiopatica. L'*Agalassia contagiosa* può infatti causare quadri clinici polimorfi spesso sovrapposti e variabili a seconda del decorso sub-acuto o cronico; tali localizzazioni seguono sempre un iniziale periodo di setticemia.

La mastite da *M. agalactiae* decorre come una mastite interstiziale, caratterizzata clinicamente da tumefazione, calore e dolorabilità iniziale dell'organo a cui segue una drastica riduzione della secrezione latte con caratteristica riduzione di volume di una o ambedue le emimammelle. Generalmente si ha la risoluzione del processo infettivo dopo qualche settimana con ripristino funzionale dell'organo anche se la produzione latte non riprende mai i livelli precedenti. Se il processo cronicizza ulteriormente si può avere sclerosi e perdita funzionale dell'organo.

La forma tipica generalmente evolve in circa un mese, la forma cronica invece può persistere anche tre mesi e l'eliminazione del microrganismo nell'ambiente con il latte e con le secrezioni, può continuare in maniera intermittente anche per un anno. Ciò spiega la difficoltà oggettiva nel fermare o controllare l'infezione una volta entrata nell'azienda.

Il secreto mammario durante l'infezione assume aspetti caratteristici con una riduzione totale del volume prodotto riducendosi a pochi ml, con chiarificazione del liquido munto tendente al giallo-citrino trasparente che lo rende simile a siero.

### **Materiali e metodi**

La presente indagine concerne esami batteriologici e di biologia molecolare su N°120 ceppi di Mycoplasmi ovi-caprini isolati da latti sospetti e provenienti rispettivamente per l'87,6% da latte ovino, l'11,4% da latte misto caprino ed ovino e soltanto lo 0,9% da latte di capra.

Per l'isolamento dei Mycoplasmi dal latte è stato impiegato un terreno di coltura selettivo presente in commercio (Oxoid), secondo la formula di Hayflick (Hayflick L. Texas Rep. Biol. E. Med. 23 supp. I: 285-303, 1965) addizionato di estratto di lievito, DNA, siero equino nonché inibenti per evitare contaminazioni durante la crescita.

L'incubazione veniva effettuata a 37° C in microaerofilia (10% CO<sub>2</sub>).

Le piastre di agar Mycoplasma venivano incubate almeno 10 giorni prima di poter dare esito negativo.

Una volta evidenziate le colonie caratteristiche, si procedeva con l'identificazione biochimica convenzionale come descritto in tabella 1.

### **Tabella 1**

- FERMENTAZIONE DEL GLUCOSIO
- IDROLISI DELL'ARGININA
- RIDUZIONE DEL TETRAZOLIO (AER./ANAER.)
- IDROLISI DELL'UREA
- DIGESTIONE DELLA CASEINA
- LIQUEFAZIONE DEL SIERO
  
- PRESENZA DI FILM-SPOT
- ODORE DELLE COLTURE

I ceppi isolati venivano successivamente liofilizzati per essere secondariamente testati con le metodiche di Biologia molecolare (PCR).

I test di biologia molecolare per *M. agalactiae* sono stati effettuati secondo il test della Polimerase chain reaction impiegando differenti primers come nella tabella di seguito riportata:

Primers DEDIEU	<i>M.agalactiae</i>
Primers JOHANSSON	<i>M.agalactiae</i>
Primers BASHIRUDDIN	<i>M.m.mycoides LC</i>
	<i>M.m.mycoides SC</i>
	<i>M.c.capri</i>
	<i>M.c.capricolum</i>
	<i>M.c.capripneumoniae</i>

Nel caso le due prove di PCR risultavano entrambe negative si riconosceva la specie secondo le tecniche biochimiche convenzionali.

Si è provveduto inoltre ad esaminare istologicamente n° 4 mammelle positive per *M.agalactiae* ove non si aveva avuto riscontro di altri patogeni mammari specifici e di germi opportunisti.

Una volta fissati in formalina tamponata al 10%, si procedeva alla inclusione in paraffina secondo le procedure di processazione convenzionale ed alla colorazione delle sezioni tramite Ematossilina Eosina.

## Risultati

Dei 120 ceppi saggiati alle prove biochimiche n° 107 hanno dato esito negativo per tutte le prove ad eccezione della riduzione del tetrazolio sia in aerobiosi che in anaerobiosi. N° 11 stipiti hanno reagito in maniera dubbia al tetrazolio con positività limite per quanto concerne la prova in anaerobiosi. Tali ceppi non sono stati pertanto classificati con le prove biochimiche. Soltanto due stipiti hanno presentato un comportamento biochimico differente con positività alla fermentazione del glucosio, alla caseina, alla digestione del siero equino. N° 118 ceppi hanno prodotto film-spot su agar Hayflick mentre i due ceppi glucosio positivi sono risultati film-spot negativi. Non si è rilevato mai alcun odore caratteristico delle colonie sinora isolate.

Il test della PCR ha confermato le prove biochimiche ed ha inoltre caratterizzato anche gli altri 11 ceppi dubbi alla prova del tetrazolio come *M.agalactiae* per un totale complessivo di 118 ceppi di *M.agalactiae* (98.4%).

I due ceppi biochimicamente differenti sono stati tipizzati alla PCR come *M.m.mycoides* (1.6%).

Le alterazioni istopatologiche osservate nel parenchima mammario in tre dei quattro organi esaminati, erano costituite da infiltrato linfoplasmogranulocitario con presenza di discreta quantità di eosinofili e conseguente espansione dell'interstizio. Le quote ghiandolari si presentavano collassate e si denotavano elementi ghiandolari con aspetti regressivi dell'epitelio caratterizzato da vacuolizzazione e distacco di cellule dalla parete. L'infezione presentava aspetti focali con alternanza di lobuli integri contemporanei alle aree di flogosi.

All'interno dei dotti ghiandolari si evidenziava desquamazione cellulare rappresentata da cellule schiumose e materiale proteico denso. Venivano osservati in una singola mammella fenomeni di sclerosi e sostituzione adiposa con persistenza di flogosi a carico dei lobuli residui.

## **Conclusioni**

I dati riportati confermano, anche in Sicilia, l'eziologia caratteristica della mastite in corso di infezione da *Agalassia contagiosa* che riconosce quale agente specifico il *Mycoplasma agalactiae*

L'isolamento di due ceppi di *Mycoplasma m.mycooides* ed il mancato riscontro di altre specie appartenenti all'"Agalactiae complex" (*M.capricolum*, *M.putrefaciens*), non conferisce ai caprini, in questa indagine preliminare, un particolare ruolo nell'endemismo dell'infezione nella Regione.

La prova della PCR si è dimostrata più utile nella determinazione di specie anche dove le prove biochimiche risultavano dubbie.

Anche se in un numero limitato di campioni, relativo ad infezione specifica da *M.agalactiae*, gli aspetti istopatologici hanno confermato il quadro lesivo classico dell'infezione.

Possiamo quindi concludere che l'impiego di metodiche innovative come la PCR fornisce un strumento ulteriore nello studio e nella conoscenza di patologie i cui agenti non sono sempre facilmente identificabili. Si auspica pertanto una sempre maggiore integrazione di tali metodiche innovative nella diagnostica veterinaria.

## **Bibliografia**

- 1) BASHIRUDDIN J. ET AL., 1994: Vet. Diagn. Invest, 6, 428-434
- 2) CHAVEZ-GONCALVE, Y. ET AL., 1994: Veterinary-Microbiology. 43, 183-190

- 3) DEDIEU L., BREARD A., LEFEVRE P.C., 1992: Development of a species-specific DNA probe for *Mycoplasma capricolum*. *Veterinary-Microbiology*, 32: 2, 189-197;
- 4) DEDIEU L., MADY V., LEFEVRE P.C., 1995: Development of two PCR assays for the identification of mycoplasmas causing Contagious agalactia. *Fems-Microbiology-Letters*, 129: 2-3, 243-249;
- 5) GUARDA F., MANDELLI G., 1989: *Trattato di Anatomia Patologia Veterinaria*, II Ediz., UTET
- 6) JOHN G. HOLT, NOEL R. KRIEG, PETER H.A. SNEATH, JAMES T. STANLEY, 1994: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Ninth Edition
- 7) MARCATO P.S., 1992: *Patologia Mammaria Animale*. I Ediz., Edagricole
- 8) MONTAGNA C.O., GOFFREDO G., 1989: L'Agalassia contagiosa degli ovini e dei caprini in Puglia e Basilicata. *Obiettivi e Documenti Veterinari*, 10: 3, 17-20;
- 9) TOLA S., ANGIOI A., ROCCHIGIANI A.M., IDINI G., MANUNTA D., GALLERI G., LEORI G., 1997: Detection of *Mycoplasma agalactiae* in sheep milk sample by polymerase chain reaction. *Veterinary-Microbiology*, 54:1, 17-22;
- 10) TOLA S., IDINI G., MANUNTA D., GALLERI G., ANGIOI A., ROCCHIGIANI A.M., LEORI G., 1996: Rapid and specific detection of *Mycoplasma agalactiae* by polymerase chain reaction. *Veterinary-Microbiology*, 51: 1-2, 77-84;

## CONTRIBUTO ALLO STUDIO DELL'EMOPERICARDIO NEL CANE

Guarda F. \*; Giraldo A. \*

\* *Centro di Riferenza di Patologia Comparata "Bruno Maria Zaini", Dipartimento di Patologia Animale, Università di Torino*

Nel cane il versamento ematico è una delle affezioni non molto comuni del pericardio e il liquido in esso raccolto è di colore rosso scuro e solitamente non è coagulato ( Nelson e Couto, 1992).

In questa specie animale le cause di effusione pericardica possono essere diverse, quali: chemodectoma, emangiosarcoma, tumore tiroideo o paratiroideo ectopico, timoma, malattie metastatiche, effusioni idiopatiche benigne, pericarditi traumatiche, pericarditi infettive (leptospirosi, actinomicosi, coccidioidomicosi, etc.), rottura dell'atrio sinistro secondaria a insufficienza mitralica, pericarditi costrittive, ernia diaframmatica peritoneo-pericardica, cisti pericardiali, pericardite uremica.

A seconda della causa che ha determinato il versamento, il sangue che si libera riempie più o meno rapidamente il sacco pericardico determinando un emopericardio, e in casi estremi si può avere morte per tamponamento cardiaco.

Secondo Berg e Wingfield (1984) la principale causa di effusione emorragica pericardica è la neoplasia, e i principali tumori in causa sono gli emangiosarcomi, i tumori della base del cuore e i mesoteliomi del pericardio.

A differenza dell'uomo, in cui l'emangiosarcoma primitivo del cuore è una condizione piuttosto rara (Dvorak e coll., 1966) nel cane sembra essere il tumore primitivo più frequente e l'età media è di circa 10 anni, con un range di 6-14 anni (Kleine e coll., 1970; Aronsohn, 1985) e secondo Stünzi e Amman-Mann (1972) l'emangiosarcoma cavernoso è la causa più frequente di rottura della parete dell'atrio destro.

L'emopericardio conseguente alla rottura di una parete cardiaca nel cane è una condizione rara, ma possibile soprattutto in seguito ad alterazioni all'orecchietta destra o sinistra (Stünzi e Amman-Mann, 1970). Tuttavia se la rottura è lenta e incompleta si può formare un trombo organizzato ed un ematoma che, insieme con il pericardio,

sigillano la rottura e prevengono la formazione di un emopericardio (Braunwald, 1988).

Una delle cause di emopericardio nel cane, anche se rara, è la rottura dell'atrio come conseguenza di uno splitting atriale che può cedere o rompersi (Gaillot e Pouchelon, 1994 ; Komitor 1976 ; Berry e coll., 1988).

L'emopericardio può essere conseguente anche alla rottura dell'aorta nel tratto compreso nel sacco pericardico, ma nel cane è molto rara a differenza del cavallo (Guarda e Mandelli, 1989).

La rottura cardiaca può essere secondaria ad infarti, conseguenza piuttosto comune nell'uomo (Braunwald, 1988 ; Buffa e coll., 1976 ; Having, 1973) a differenza del cane in cui è una condizione molto rara. In questa specie animale l'infarto miocardico può essere la conseguenza di trombo-embolismi batterici o neoplastici (Hect e Detweiler, 1965) . Ancora la rottura cardiaca può conseguire ad aneurismi, o essere conseguenza di una perforazione di un ascesso, oltre ovviamente ad una perforazione traumatica del cuore che nel cane può conseguire ad una lacerazione iatrogena di un'arteria coronarica durante la pericardiocentesi (Nelson e Couto, 1992). E' stato dimostrato che le razze condro-distrofiche sono più soggette a rotture spontanee per una predisposizione di razza, mentre nei pastori tedeschi sono più frequenti i tumori vascolari (Stünzi e Ammann-Mann, 1972; Berg e Wingfield, 1984; Aronsohn, 1985; Kleine e coll., 1970).

## **Materiali e metodi**

Il nostro studio è stato eseguito su cani inviati al Dipartimento di Patologia Animale della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Torino in un arco di anni compreso tra il 1981 e il 1998, sui quali è stata svolta un'indagine necroscopica e il materiale oggetto di studio è stato prelevato, fotografato, fissato in formalina tamponata al 10%, incluso in paraffina, colorato con le comuni tecniche istologiche ed osservato al microscopio ottico.

## **Risultati**

In un periodo di anni compreso tra il 1981 e il 1998 in 24 cani (Tab.1) l'esame necroscopico ha permesso di evidenziare un emopericardio. Il sangue contenuto nel

sacco pericardico era per la maggior parte libero e conteneva frustoli di coaguli più o meno grossi.

In 15 di essi (Tab.1 e 2) l'esame anatomo-patologico ha evidenziato una o più masse solide, di consistenza morbida, di colore rosso vinoso, dalle dimensioni variabili da 1 a 3-4 cm, di forma sferica o digitiforme, localizzata sulla parete dell'atrio destro o dell'orecchietta corrispondente. Quando tale massa era di dimensioni notevoli comprendeva sia l'atrio che l'orecchietta.

Solo in due casi (Tab.1 e 2) una massa analoga era localizzata sull'atrio sinistro.

Non erano infrequenti delle metastasi in corrispondenza del setto interventricolare e/o della parete del ventricolo sinistro.

Al taglio le neoformazioni avevano un aspetto omogeneo e nel punto in cui si infiltravano nella parete dell'atrio si poteva evidenziare erosione dell'endocardio e rottura della parete. In questa sede erano presenti coaguli di sangue.

Le caratteristiche anatomopatologiche macroscopiche permettevano di avanzare il sospetto di emangiosarcoma, confermato da un attento esame istologico che ha potuto evidenziare la presenza di cellule endoteliali immature che formavano degli spazi vascolari molto simili a piccole fenditure, ma più spesso formanti dei veri canali o lacune cavernose. Questi spazi vascolari contenevano quantità variabili di sangue che qualche volta formava dei veri trombi.

Le cellule neoplastiche apparivano di dimensioni variabili, ma comunque piuttosto grosse. I nuclei apparivano rotondeggianti o ovoidali ipercromatici. Erano presenti alcune figure mitotiche. Il connettivo stromale non era facilmente distinguibile nel contesto della massa neoplastica, di più facile riscontro erano dei macrofagi repleti di emosiderina e dei leucociti polimorfonucleati.

In un cane meticcio maschio di 16 anni (Tab.1) è stato riscontrato una neoplasia mista rappresentata da un tumore delle tiroidi ectopiche e da un chemodectoma della base del cuore che ha dato metastasi sulla parete del ventricolo destro. Il tumore delle tiroidi ectopiche era frammisto al chemodectoma. In una piccola porzione periferica si è però potuto evidenziare la presenza di una zona che ricordava gli alveoli tiroidei con follicoli di diametro diverso, più o meno regolari, rivestiti internamente da un epitelio cubico. Alcuni erano otticamente vuoti, altri presentavano residui di materiale coagulato o erano repleti di sangue. Taluni follicoli erano enormemente dilatati, di forma irregolarmente cilindrica o con la parete del tutto irregolare. In un altro settore i

follicoli tiroidei irregolari erano separati da travate connettivali. Il tutto faceva supporre si trattasse di un adenocarcinoma tiroideo.

**Tabella 1**

RAZZA	ETA'	SESSO	LOCALIZZAZIONE	DIAGNOSI
Meticcio	8AA	M	Atrio destro	EMANGIOSARCOMA
Pastore tedesco	6AA	M	Atrio destro	EMANGIOSARCOMA
Pastore tedesco	9AA	M	Atrio destro	EMANGIOSARCOMA
Boxer	10AA	F	Atrio destro	EMANGIOSARCOMA
Meticcio	4AA	M	Atrio sinistro	MIOCARDITE ED EPICARDITE
Pastore tedesco	9AA	M	Atrio destro	EMANGIOSARCOMA
Meticcio	16AA	M	Atrio destro e ventricolo sinistro	TUMORE MISTO
Meticcio	Adulto	M	Atrio destro	EMANGIOSARCOMA
Pastore tedesco	11AA	M	Atrio destro	EMANGIOSARCOMA
Pastore tedesco	10AA	M	Atrio sinistro	EMANGIOSARCOMA
Pastore tedesco	12AA	M	Atrio destro	EMANGIOSARCOMA
Setter	5.5.AA	F	Atri destro	EMANGIOSARCOMA
Pastore tedesco	9AA	M	Atrio destro	EMANGIOSARCOMA
Airdale	15AA	M	Atrio sinistro	MIOCARDITE ED EPICARDITE
Schnauzer	8AA	M	Atrio destro e metastasi cardiache	EMANGIOSARCOMA
Pastore tedesco	6AA	M	Atrio sinistro	EMANGIOSARCOMA
Meticcio	8AA	M	Atrio destro	EMANGIOSARCOMA
Meticcio	12AA	F	Atrio destro e metastasi ventricolo sinistro e setto interventricolare.	EMANGIOSARCOMA
Boxer	13AA	F	Atrio e ventricolo destro	TUMORE MISTO
Meticcio	11AA	M	Atrio destro	EMANGIOSARCOMA
Meticcio	16AA	F	Atrio destro	EMANGIOSARCOMA
Meticcio	12AA	M	Atrio destro	CHEMODECTOMA
Segugio italiano	Adulto	M	Ventricolo sinistro	PROIETTILE DA ARMA DA FUOCO
Meticcio	1,5AA	F	Ventricolo sinistro	TRAUMA DA INVESTIMENTO

**Tabella 2**

TIPO DI LESIONE	LOCALIZZAZIONE	FREQUENZA	%
EMANGIOSARCOMA PRIMARIO	ATRIO DESTRO	15	62,5
EMANGIOSARCOMA PRIMARIO	ATRIO SINISTRO	2	8,3
ROTTURA TRAUMATICA	VENTRICOLO SINISTRO	2	8,3
CHEMODECTOMA	ATRIO DESTRO	1	4,2
TUMORE MISTO	ATRIO DESTRO	2	8,33
MIOCARDITE ED EPICARDITE	ATRIO SINISTRO	2	8,33

La massa neoplastica di 3x2 cm era situata tra l'arteria polmonare e l'aorta. Istologicamente presentava vasti fenomeni necrotici ed emorragici che infiltravano il tessuto neoformato. La maggior parte della neoformazione era costituita dalla tipica morfologia del chemodectoma, ossia cellule a colonna o pseudorosette separate da travate connettivali di volume diverso. Dalle travate più grosse si diramano quelle più piccole. Le cellule neoplastiche in alcuni settori presentano nuclei grandi e mostruosi. L'endocardio corrispondente presenta fenomeni trombotici infiltrati massivamente dalle cellule neoplastiche. Le metastasi presenti sulla parete del ventricolo destro ricordavano del tutto la struttura del chemodectoma. Le cellule neoplastiche infiltravano massivamente il miocardio e ne alteravano la struttura tanto da determinare la formazione di un estesa area emorragica e di un grosso coagulo sanguigno anch'esso infiltrato di cellule neoplastiche.

La massa neoplastica risultava circondata da una capsula fibrosa che in alcuni punti era molto sottile, in altri di maggiore spessore. I vari strati della capsula erano invasi dall'infiltrazione di cellule neoplastiche derivate dal chemodectoma.

Un tumore misto è stato riscontrato anche in un boxer femmina di 13 anni (Tab.1) rappresentato da una massa neoplastica di aspetto emorragico a cavallo tra l'atrio e il ventricolo destro in corrispondenza dell'ostio A-V destro, di 3x4 cm. Esternamente la massa era erosa ed aveva dato origine all'emopericardio. Erano altresì presenti delle metastasi sul pericardio in corrispondenza dell'attaccatura con il cuore, due di queste erano grosse come un chicco di riso e una come un fagiolo. L'esame istologico ha potuto evidenziare che sia la massa neoplastica che le metastasi si trattavano di un emangiosarcoma con le caratteristiche simili a quelli descritti in precedenza. La seconda massa neoplastica era posta sulla base del cuore tra l'arteria polmonare e l'aorta, sopra l'atrio destro, di aspetto bitorzolato e di 2x3 cm di diametro. Il primo sospetto era che si trattasse di un chemodectoma, successivamente confermato dall'esame istologico.

In un boxer maschio di 12 anni (Tab.1) è stato trovato un chemodectoma con aspetto caratteristico e ampi fenomeni necrotici, autolitici e emorragie, che ha dato metastasi alla base della parete del ventricolo destro. Quest'ultima risultava completamente infiltrata da cellule neoplastiche che hanno determinato uno scompaginamento delle fibre miocardiche con la formazione di un estesa area emorragica che interessava a tutto spessore la parete e di un coagulo di 2 X 1,5 cm che

in un punto della capsula si presentava rotto. Verso l'apice cardiaco, sempre in ambito miocardico, era possibile osservare aree metastatiche del chemodectoma. Metastasi erano anche visibili nel grasso della base del cuore e dei vasi linfatici in cui era possibile notare un nodulo compatto di cellule neoplastiche.

In due cani, un meticcio di 4 anni maschio e un Airdale di 15 anni maschio (Tab.1), all'esame anatomo-patologico si è riscontrato un abbondante emopericardio che ha causato morte improvvisa per tamponamento cardiaco. Nel cane meticcio si è poi trovata una rottura dell'atrio destro, mentre nel l'Airdale una rottura dell'atrio sinistro in un area necrotico emorragica. Nel primo istologicamente si è riscontrata un'estesa miocardite ed un'epicardite cronica ed endocardiosi delle valvole atrioventricolari. Nel secondo è stato possibile evidenziare un'estesa miocardite con scompaginamento delle fibre muscolari per infiltrazione edematosa ed emorragica, ed inoltre estese aree di necrosi soprattutto in corrispondenza della zona di rottura.

La rottura cardiaca traumatica si è potuta osservare in due cani (Tab.1), un segugio italiano maschio adulto con rottura della parete del ventricolo sinistro causato da un proiettile da arma da fuoco; e un meticcio femmina di 1,5 anni con rottura della parete libera del ventricolo sinistro determinata da un investimento automobilistico.

### **Considerazioni e conclusioni**

L'emopericardio del cane non risulta essere molto frequente anche se può essere causato da svariati fattori eziologici quali neoplasie, flogosi miocardiche, splitting endocardici, cause infettive oppure ancora non conosciute.

Infatti secondo Stünzi e Amman-Mann (1970) l'emopericardio in questa specie animale si diagnostica in meno dell'1% degli animali sottoposti alla necropsia.

In ogni caso la causa più frequente dell'emopericardio è da ricondurre alla localizzazione primitiva dell'emangiosarcoma sulla parete dell'atrio destro con conseguente rottura della parete atriale.

La maggior parte degli Autori che si sono interessati all'argomento concordano su questo rilievo.

Secondo Hulland (1990) questa neoplasia è la più frequente nel cane di età media di 9-10 anni e il pastore tedesco è la razza più colpita.

Aronsohn (1985) su 38 emangiosarcomi cardiaci rilevò su 29 casi la localizzazione all'atrio destro. Per Kleine e coll. (1970) su 61 casi 31 erano primitivi

del cuore (50%) e ben 30 originavano dall'atrio destro; Person e Head (1976) osservarono che su 25 animali 10 originavano dall'atrio destro.

Secondo Berg e Wingfield (1983) su 42 casi di effusione pericardica, 24 erano causati da neoplasie e di questi 14 da emangiosarcoma, 5 da chemodectoma, 2 da adenocarcinomi metastatici, 1 da linfo sarcoma, 1 da timoma e 1 da tumore maligno della base del cuore non classificato.

Anche per questi AA il pastore tedesco è la razza più predisposta per l'emangiosarcoma all'atrio destro.

Soltanto Brown e coll. (1985) in uno studio retrospettivo su 104 cani rilevarono il 63% di tumori primitivi nella milza e soltanto il 3% primitivi del cuore. Naturalmente nei casi di tumori più generalizzati non è facile distinguere la localizzazione primitiva.

Stünzi e Amman-Mann (1973) su 4033 cani sottoposti alla necropsia riscontrarono 14 rotture della parete dell'atrio destro da emangiosarcoma, 11 rotture della parete dell'atrio sinistro da endocardiosi e dilatazione atriale da insufficienza valvolare e 5 casi di rotture cardiache di origine traumatica.

Certamente meno frequenti sono le rotture cardiache dallo spitting della parete atriale conseguente alla insufficienza valvolare mitralica, descritta occasionalmente da Buchanan e Kelly (1964), da Luginbühl e Detweiler (1965), da Ettinger e Suter (1970), da Komitor (1976), da Berry e coll. (1988), da Berg e Wingfield (1983), da Gaillot e Pouchelon (1994) e da Horzinek e coll. (1974).

Altrettanto raro è l'emopericardio conseguente a miocardite della parete dell'atrio sinistro (Harpster, 1969) così come da chemodectoma della base del cuore (Di Fruscia e coll., 1989), da rhabdomiosarcoma della parete dell'atrio destro (Gonin-Jmaa e coll., 1996), da mesotelioma pericardico (Ikede e coll., 1980), da adenocarcinoma della tiroide ectopica (Chetboul e coll., 1995) o idiopatico (Matthiesen e Lammerding, 1985; Gibbs e coll., 1982; De Madron e coll., 1987) oppure infettivo (Lorenzana e coll., 1984).

Non è facilmente spiegabile la preferenziale localizzazione dell'emangiosarcoma sulla parete dell'atrio destro. D'altra parte la più ricca vascolarizzazione di capillari su questa parete rispetto a quella dell'atrio sinistro potrebbe giustificare soltanto in parte tale predilezione come sostengono pure Stünzi e Amman-Mann (1973).

Dal punto di vista comparato esistono notevoli differenze in questa problematica tra il cane e l'uomo. Infatti in quest'ultimo le rotture del cuore conseguono in genere ad infarti miocardici in circa l'11,5%.

Il reperto più caratteristico per questi casi è stata l'occlusione trombotica di un'arteria coronarica e la necrosi transmurale del cane (Having, 1973). Anche secondo Buffa e coll. (1976) la rottura del cuore postinfartuale può variare dal 13 % al 34%.

Nell'uomo metastasi neoplastiche al pericardio sono causa di emopericardio (Darsee e Braunwald, 1980; Zipf e Johnston, 1972) infatti il cuore dell'uomo è coinvolto nel 10% dei casi di tumori maligni e di questi il 15 % con localizzazione al pericardio (Darsee e Braunwald, 1980).

Anche i risultati ottenuti dalla nostra ricerca (Tab.2) confermano i dati degli AA che ci hanno preceduto e cioè che l'emangiosarcoma è la causa più frequente dell'emopericardio nel cane e che i maschi sono più predisposti delle femmine. D'altra parte questa lesione neoplastica è da iscriversi nelle patologie da senescenza in quanto colpisce gli animali dopo i 5 anni di età con un range dai 6 ai 14 anni.

Inoltre ci preme sottolineare come soltanto la toracocentesi e l'esame post mortem possono definire esattamente la diagnosi, in quanto dagli esami clinici di laboratorio non sempre risultano elementi diagnosticabili decisivi. D'altronde già Aronsohn (1985) aveva sostenuto che le caratteristiche cliniche della malattia non sono specifiche, anche se l'ecografia è comunque la tecnica più accurata per confermare in vivo il sospetto o per scoprire la presenza di effusione pericardica (Aronsohn, 1985; Berg e Wingfield, 1984).

## **Bibliografia**

- 1) Aronsohn M.: Cardiac hemangiosarcoma in the dog: A review of 38 cases. *J.Am.Vet.Med.Assoc.*, **187**, 922-926, 1985.
- 2) Berg R.J.; Wingfield W.: Pericardial effusion in the dog: a review of 42 cases. *J. Am. Anim.Hosp. Ass.*, **20**, 721-730, 1984.
- 3) Berry C.R. e Hager D.A.: Pericardial effusion secondary to chronic endocardiosis and left atrial rupture in a dog. *Comp. Small Anim.*, **10**, 800-805, 1988.
- 4) Braunwald E.: Heart disease, A textbook of cardiovascular medicine, III ed., Ed. Saunders, 1281-1283, 1988.
- 5) Brown N.O.; Patnaik A.K.; MacEwan E.G.: Canine hemangiosarcoma. *J.Am.Vet.Med. Assoc.*, **186**, 56-58, 1985.

- 6) Buchanan J.W. e Kelly A.M.: Endocardial splitting of the left atrium in the dog. *J.Am.Vet.Radiol. Soc.*, **5**, 28-39, 1964.
- 7) Buffa D.; Carli C.; Barabino C.; Bettoschi U.; Ceppa P.; Figari G.; Friedrich G.; Pierrri I.; Tobia F.; Vitale A.: Rilievi sulle rotture del cuore in infarto recente del miocardio. *Path.*, **68**, 393-404, 1976.
- 8) Chetboul V.; Lugardon B.; Pouchelon J.L.; Rollin N. e Donzeaux V.: Un épanchement *péricardique dû à un adénocarcinome thyroïdien ectopique chez une chienne. Rec. Méd. Vét.*, **171**, 499-504, 1995.
- 9) Darsee J.R. e Braunwald E.: Diseases of the pericardium, in: Heart disease, Braunwald E., editor W.B. Saunders Co., Philadelphia, pp. 1517-1582, 1980.
- 10) De Madron E.; Prymak C.; Hendricks J.: Idiopathic hemorrhagic pericardial effusion with organized thrombi in a dog. *J.Am.Vet.Med.Assoc.*, **191**, 324-326, 1987.
- 11) Di-Fruscia R.; Perrone M.A.; Bonneau N.H. e Breton C.: Heartbase tumor and pericardial effusion in a dog. *Can. Vet. J.*, **30**, 150-154, 1989.
- 12) Dvorak R.; Melichar F.; Jdlicka V.; Svejda J.: Primary malignant Hemangioma of the heart. *J. Path. & Bact.*, **92**, 564-567, 1966.
- 13) Ettinger S.J. e Suter P.F.: Canine cardiology. W.B. Saunders Co., Philadelphia, Pa., pp.361-366, 1970.
- 14) Gaillot H. e Pouchelon J.L. : Un cas d'épanchement *péricardique consécutif une rupture de l'atrium gauche chez un chien. Rec. Med. Vet.*, **170**, 17-22, 1994.
- 15) Gibbs C.; Gaskell C.J.; Darke P.G.G.; Wotion P.R.: Idiopathic pericardial haemorrhage in dogs: a review of fourteen cases. *J.Small Anim.Pract.*, **23**, 483-500, 1982.
- 16) Gonin-Jmaa D.; Paulsen D.B.; Taboada J.: Pericardial effusion in a dog with rhabdomyosarcoma in the right ventricular wall. *J.Small Anim.Pract.*, **37**, 193-196, 1996.
- 17) Guarda F. e Mandelli : Trattato di anatomia patologica veterinaria, Ed. UTET, p. 401, 1989.
- 18) Harpster N.K.: Case Records of the Angell Memorial Animal Hospital. *J.Am.Vet.Med.Assoc.*, **154**, 413-424, 1969.
- 19) Havig Ö. : Cardiac rupture in recent myocardial infarction. *Acta Path. Microbiol.scand. Section A*, **81**, 501-506, 1973.
- 20) Hecht H.H. e Detweiler D.K.: Annals of the New York Academy Of Sciences, vol.127 art.1, Ed. Harold E. Whipple, p.522, 1965.
- 21) Horzinek B.; Ingh (TSGAM van den); Stokhof (A.A.): Spontane Atrium-Rupture bei einem teckel. *Kleinter-Praxis*, **19**, 122-124, 1974.
- 22) Hulland T.J.: Tumours of the muscle. In: Tumours in Domestic Animals. III ed. Ed J.E. Multon. University of California Press, Berkley. Pp 93-101, 1990.

- 23) Komitor A.: Left atrial rupture, *Vet. Med. Small Anim. Clin.*, **71**, 620-621, 1976.
- 24) Kleine L.J.; Zook B.C.; Munson T.O.: Primary cardiac Hemangiosarcomas in dogs. *J.Am.Vet.Med.Assoc.*, **157**, 326-337, 1970.
- 25) Ikede B.O.; Zubaidy A.; Gill C.W.: Pericardial mesothelioma with cardiac tamponade in a dog. *Vet.Pathol.*, **17**, 496-499, 1980.
- 26) Lorenzana R.; Richter K.; Ettinger S.J.; Lippincott C.L.; Kisseberth W.C.: Infectious pericardial effusion in a dog. *J.Am.Anim.Hosp.Ass.*, **21**, 725-728, 1985.
- 27) Luginbühl H. e Detweiler D.K.: Cardiovascular lesions in dogs. *Ann. New York Acad. Sci.*, **127**, 517-538, 1965.
- 28) Matthiesen D.T. e Lammerding J.: Partial Pericardiectomy for idiopathic hemorrhagic pericardial effusion in the dog. *J.Am.Anim.Hosp.Ass.*, **21**, 41-47, 1985.
- 29) Nelson R.W. e Couto C.G.: *Essential of small animal internal medicine*. Mosby-Year Book, Inc., 1992.
- 30) Person L.R.; Head K.W.: Malignant hemangioendothelioma (angiosarcoma) in the dog. *J.Small anim. Pract*, **17**, 737-745, 1976.
- 31) Stünzi H. e Mann M.: Pathology of haemopericardium in the dog. *Schweitzer Arch. Tierheilk*, **112**, 233-239, 1970
- 32) Stünzi H. e Ammann-Mann M.: Nicht-traumatische Rupturen des Herzvorchofs beim Hund. *Zbl. Vet. Med. A*, **20**, 409-418, 1973.
- 33) Zipf R.E. e Johnston W.W.: The role of cytology in the evaluation of pericardial effusions. *Chest*, **62**, 593-596, 1972.

# CARATTERIZZAZIONE DEL PROFILO ISTOLESIVO ED IMMUNOLOCAZZAZIONE DELLA PrP<sub>sc</sub> IN CASI NATURALI DI SCRAPIE OVINA.

**AGRIMI U.\*, DI GUARDO G.°, ELENI C.°, MARCON S.\*,  
DI BARI M.A.\*, LIGIOS C.#, FAZZI P.\*, CARDONE F.\*\*,  
POCCHIARI M.\*\*.**

*Istituto Superiore di Sanità, (\*) Laboratorio di Medicina Veterinaria e  
(\*\*) Laboratorio di Virologia, viale Regina Elena 299 - 00161 ROMA.  
(°) Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, via  
Appia Nuova 1411 - 00178 ROMA.  
(#) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna "G. Pegreff", via  
Duca degli Abruzzi 8 - 07100 SASSARI.*

## **RIASSUNTO**

Gli Autori descrivono i quadri istopatologici e l'immunolocalizzazione della GFAP e della PrP<sub>sc</sub> in 25 aree del SNC di 8 ovini con scrapie naturale, provenienti da due allevamenti della Sardegna.

Il profilo lesivo appariva sostanzialmente omogeneo fra i due gruppi di animali. In proposito, reperti di marcata spongiosi erano evidenti soprattutto a carico delle porzioni sottocorticali del telencefalo (setto, nucleo caudato) e del diencefalo (talamo, ipotalamo, corpi mammillari), mentre la vacuolizzazione neuronale era localizzata pressochè esclusivamente nei nuclei del mesencefalo e del midollo allungato.

L'astrocitosi, presente in tutti i casi esaminati, si apprezzava particolarmente a livello di setto, talamo, mesencefalo e midollo spinale.

Immunoistochimicamente, la presenza di PrP<sub>sc</sub>, sotto forma di fini granulazioni o di inclusioni tondeggianti in sede citoplasmatica, risultava evidente soprattutto a carico dei neuroni di mesencefalo, ponte e midollo allungato. Depositi di PrP<sub>sc</sub> erano pure localizzati tra i fasci di fibre della sostanza bianca del tronco encefalico. Nelle stesse sedi anatomiche si osservavano elementi cellulari, GFAP-negativi, all'interno dei quali era presente un piccolo nucleo centrale ipercromatico da cui si dipartivano processi, PrP<sub>sc</sub>-positivi, disposti a raggiera. Positività citoplasmatica era apprezzabile anche a livello di alcuni astrociti. Depositi marcati di PrP<sub>sc</sub> erano presenti attorno ai vasi, specialmente quelli della sostanza bianca, nonchè in sede subependimale e subpiaie.

Il quadro clinico e lesivo sostanzialmente omogeneo portano a supporre una identità del ceppo, o dei ceppi coinvolti nei due focolai di malattia.

**Parole chiave:** scrapie, ovino, PrP<sub>sc</sub>, immunoistochimica.

## **INTRODUZIONE**

La scrapie della pecora e della capra appartiene al gruppo delle encefalopatie spongiformi trasmissibili (EST) o malattie da prioni (1). Queste sono causate da agenti la cui natura non è stata ancora definitivamente chiarita e sono caratterizzate dall'accumulo, in sede cerebrale, della isoforma alterata, denominata PrP<sub>Sc</sub> (da "scrapie"), di una sialoglicoproteina cellulare indicata come PrP<sub>C</sub> (da "cellulare") (1).

Tra le EST, la scrapie rappresenta la patologia più studiata sia in condizioni sperimentali che naturali. Le ricerche su questa malattia hanno contribuito in maniera determinante alla comprensione della patogenesi, dell'epidemiologia e dei meccanismi di trasmissione di questo gruppo di malattie ed hanno condotto, più di 30 anni fa, alla fondamentale scoperta dell'esistenza di differenti ceppi di agente della scrapie (2). Da allora sono stati identificati, in base alle caratteristiche cliniche e patologiche della malattia trasmessa su linee murine inbred, circa 20 diversi ceppi (3). I risultati di tali ricerche, difficilmente spiegabili senza ipotizzare il possesso, da parte dell'agente, di un acido nucleico, hanno avuto importanti implicazioni negli studi di eziopatogenesi delle EST e rappresentano uno dei maggiori ostacoli interpretativi della teoria prionica, che sostiene la natura esclusivamente proteica dell'agente delle EST (4).

Lo studio dei ceppi negli animali da laboratorio ha però portato a trascurare le indagini sul significato biologico della loro esistenza e sulle possibili implicazioni di questi nell'epidemiologia e nella patogenesi dell'infezione naturale. Sebbene non siano mai stati condotti studi specifici in tal senso, è facile però ipotizzare che le differenti manifestazioni cliniche e patologiche segnalate nei diversi focolai di scrapie naturale non siano occasionali ma legate al particolare ceppo di scrapie in causa ed alle caratteristiche della popolazione ovina ospite (5). Anche lo studio del quadro lesivo cerebrale si è sempre limitato alla descrizione di singoli casi di malattia e non sono mai stati condotti studi comparativi su soggetti provenienti da differenti focolai di infezione. Tali carenze derivano in gran parte dalle numerose ed imprevedibili variabili relative sia all'ospite che al ceppo di agente in causa, le quali rendono complessi l'interpretazione e il confronto dei quadri clinici e lesivi osservati in casi di scrapie naturale (6). Ciononostante, l'identificazione dei ceppi coinvolti in focolai naturali di malattia rappresenta un aspetto di indiscutibile interesse. Pertanto, nel tentativo di colmare le lacune conoscitive relative alle caratteristiche della malattia e dei ceppi responsabili dell'infezione nel nostro Paese, abbiamo ritenuto utile avviare, parallelamente alla trasmissione e caratterizzazione di ceppi su topi da laboratorio, lo studio della malattia anche nell'ospite naturale.

Nel presente lavoro vengono descritti e discussi i reperti istopatologici ed immunoistochimici osservati, in sede cerebrale, in alcuni casi naturali di scrapie ovina.

## **MATERIALI E METODI**

Gli 8 animali oggetto del presente studio provenivano da due allevamenti situati nel nord della Sardegna (7). Sette soggetti, d'età compresa tra i 22 e i 36 mesi, erano originari del primo allevamento, mentre l'ottavo animale, di 24 mesi d'età, proveniva dalla seconda azienda.

Tutti gli animali, nello stadio terminale della malattia, sono stati sacrificati e sottoposti ad autopsia nel corso della quale si è proceduto al prelievo ed alla fissazione in formalina neutra al 10% dell'encefalo. In 4 casi quest'ultimo è stato fissato *in toto*, nei rimanenti 4 la fissazione ha interessato la porzione maggiore dell'organo risultante da un taglio operato lungo la linea sagittale paramediana a partire dai lobi frontali fino al midollo allungato. La rimanente porzione di tessuto cerebrale è stata congelata subito dopo il prelievo e successivamente impiegata per la conferma diagnostica mediante western-blot. Da 5 soggetti è stato inoltre prelevato e fissato in formalina il segmento C1-C2 del midollo spinale.

Porzioni coronali interessanti i vari distretti del sistema nervoso centrale (SNC) sono state incluse in paraffina, sezionate ad uno spessore di 7  $\mu$  e colorate con ematossilina-eosina, con una metodica combinata luxol fast blue-cresyl violetto e con tecniche immunoistochimiche biotina-streptavidina-perossidasi per la dimostrazione della proteina acida gliofibrillare (GFAP) e della PrP<sub>Sc</sub>. Ai fini della immunolocalizzazione rispettivamente della GFAP e della PrP<sub>Sc</sub>, le sezioni sono state sottoposte ad un pretrattamento con pronase XIV (Sigma) allo 0,5% per 7 min a 37°C, ovvero immerse in acqua distillata ed autoclavate a 121°C per 30 min (8).

Per lo studio del profilo lesivo ci siamo riferiti, nella scelta delle aree cerebrali da esaminare, a quanto pubblicato sulla scrapie della capra (9) e sulla chronic wasting disease dei cervidi (10). In base all'entità del quadro lesivo, è stato attribuito ad ogni area un punteggio da 0 a 5, secondo i criteri utilizzati per la caratterizzazione del profilo lesivo sul topo (11).

Nel presente lavoro vengono riportati i risultati derivanti dallo studio di 25 aree rappresentative del SNC.

## RISULTATI

I risultati relativi ai quadri istopatologici osservati nei casi di scrapie oggetto del presente lavoro sono riportati nei grafici 1, 2 e 3.

Il profilo lesivo, relativamente alla spongiosi ed alla vacuolizzazione neuronale, appariva omogeneo. La prima interessava soprattutto le porzioni sottocorticali del telencefalo (setto, nucleo caudato) ed il diencefalo (talamo, ipotalamo, corpi mammillari), la seconda era localizzata pressochè esclusivamente nei nuclei del mesencefalo e del midollo allungato.

Sebbene con variazioni individuali maggiori rispetto alla vacuolizzazione, in tutti i casi esaminati era presente astrocitosi, senza che peraltro si potesse apprezzare con chiarezza una correlazione tra i due diversi aspetti lesivi.

Immunoistochimicamente, la presenza di PrP<sub>Sc</sub> risultava evidente soprattutto a livello di mesencefalo, ponte e midollo allungato. In tali sedi la positività immunoistochimica si presentava sotto forma di fini granulazioni o, più raramente, di singole o multiple inclusioni tondeggianti, occupanti il citoplasma dei neuroni. Depositi di PrP<sub>Sc</sub> particolarmente marcati erano presenti tra i fasci di fibre della sostanza bianca del tronco encefalico. Alcuni assoni apparivano talvolta positivi per gran parte della loro lunghezza. Sempre nelle stesse sedi anatomiche erano poi osservabili elementi cellulari, GFAP-negativi, caratterizzati dalla presenza di un piccolo nucleo centrale ipercromatico dal quale si

dipartivano processi, PrP<sub>Sc</sub>-positivi, disposti a raggiera. Positività citoplasmatica era apprezzabile anche a livello di alcuni astrociti. Depositi marcati di PrP<sub>Sc</sub> erano presenti, pressochè in tutte le aree considerate, attorno ai vasi, e specialmente a quelli della sostanza bianca. Depositi di PrP<sub>Sc</sub> erano infine osservabili in sede subependimale ed, in minor misura, subpiaie.

## DISCUSSIONE

Nei casi di scrapie oggetto del presente studio, la vacuolizzazione dei neuroni del tronco encefalico, universalmente considerata l'aspetto lesivo più caratteristico della malattia (6,12), era accompagnata, nei distretti anteriori dell'encefalo, da una marcata spongiosi del neuropilo. Questa, secondo Fraser, risulterebbe poco evidente nella scrapie ovina naturale e particolarmente intensa, invece, in quella sperimentale (6). Nonostante ciò, la spongiosi, nei nostri casi, osservata a livello di aree generalmente poco colpite e scarsamente considerate ai fini diagnostici, come quelle diencefaliche e sottocorticali del telencefalo, costituiva l'alterazione neuropatologica di maggiore entità. In particolare, il *nucleus accumbens septi* risultava, nella totalità dei soggetti esaminati, il distretto cerebrale più gravemente leso.

Limitatamente alle aree appena indicate, la gravità e la distribuzione della spongiosi apparivano simili a quelle descritte nella scrapie della capra (9,13).

In pecore di razza Suffolk, Hadlow et al. (12), analogamente a quanto osservato nei casi da noi studiati, hanno descritto una marcata spongiosi a livello talamico, riportando però, tra le aree più colpite, anche la corteccia cerebellare, mantenuta sostanzialmente integra nei nostri casi.

Per quanto riguarda il nostro Paese, nei casi descritti da Cravero et al. (14), le differenze più significative consistevano nella costante assenza di lesioni a livello dei gangli della base e nel raro coinvolgimento dei nuclei talamici e del corpo mammillare. Ulteriori differenze riguardavano l'interessamento, sia pur infrequente, della corteccia cerebellare e, inversamente rispetto a quanto osservato da noi, il maggior coinvolgimento delle corna ventrali del midollo spinale rispetto alle dorsali.

Le alterazioni neuropatologiche, come costantemente riportato nei casi di scrapie naturale (6), presentavano, anche negli animali oggetto del presente lavoro, una distribuzione simmetrica.

Riguardo alla localizzazione immunoistochimica della PrP<sub>Sc</sub>, appare interessante osservare come questa fosse apprezzabile soprattutto nei distretti posteriori del tronco encefalico. Particolarmente diffusa e marcata era la localizzazione della proteina nelle aree di sostanza bianca. La PrP<sub>Sc</sub>, inoltre, pur essendo sempre presente nelle aree colpite da spongiosi, era evidenziabile anche in sedi apparentemente indenni. A tale proposito, occorre sottolineare che a livello di corteccia, distretto cerebrale pressochè risparmiato dalla spongiosi, gli unici accumuli significativi di PrP<sub>Sc</sub> si osservavano attorno ai vasi e, quasi esclusivamente, attorno a quelli della sostanza bianca. L'osservazione della presenza di PrP<sub>Sc</sub> in aree apparentemente non interessate da processi lesivi, la frequente localizzazione della proteina in sede perivasale e subependimale ed i marcati depositi di questa osservabili nella sostanza bianca, consentono di

ipotizzare, oltre ad una localizzazione intracerebrale dell'agente a seguito di diffusione ematogena, che la PrP<sub>Sc</sub>, una volta prodotta dalle cellule nervose, possa essere trasportata, attraverso meccanismi sconosciuti, in aree encefaliche diverse rispetto a quelle della sua sintesi. Occorre comunque considerare che, nella sostanza bianca e nelle aree perivasali e subependimali, era apprezzabile, contestualmente a quella per la PrP<sub>Sc</sub>, una forte positività immunostochimica nei confronti della GFAP. Questo porta a considerare con attenzione anche l'eventualità di un legame patogenetico tra astrociti e PrP<sub>Sc</sub>. D'altra parte, la sintesi di PrP<sub>C</sub> e del suo RNAm, nonché l'accumulo della isoforma patologica all'interno degli astrociti, sono tutti eventi patogenetici documentati in corso di scrapie (15); al riguardo, anche nei casi da noi studiati la positività immunostochimica delle differenti cellule nervose nei confronti della PrP<sub>Sc</sub> non si limitava ai soli neuroni. Ulteriori studi volti ad indagare il ruolo delle diverse popolazioni cellulari del SNC nella sintesi e "processazione" della PrP<sub>Sc</sub> nonché a chiarire i meccanismi della diffusione ed eventualmente del trasporto della PrP<sub>Sc</sub> nel SNC, contribuirebbero a svelare importanti aspetti ancora oscuri della patogenesi di tali infezioni.

Riteniamo che lo studio del quadro lesivo in casi di scrapie naturale possa fornire interessanti indicazioni, a condizione, ovviamente, di essere in possesso di sufficienti dati anamnestici sull'ospite. Gli 8 casi da noi studiati, tutti insorti in pecore di razza particolarmente selezionata, come quella sarda, e provenienti da due allevamenti situati a poche decine di chilometri l'uno dall'altro, mostravano un quadro clinico e lesivo sostanzialmente omogeneo, analogamente a quanto si verifica nella scrapie sperimentale indotta su topi inbred con ceppi clonati di agente. Tale osservazione consentirebbe di ipotizzare una identità del ceppo, o dei ceppi di agente coinvolti nei due focolai di malattia, così come della via di infezione, elemento anch'esso condizionante, come dimostrato su modelli murini, le caratteristiche del profilo lesivo (6).

Tra i dati anamnestici relativi all'ospite, riteniamo infine essenziale acquisire informazioni sulle caratteristiche genetiche dei soggetti colpiti. E' noto infatti che nella pecora, a livello del gene che codifica per la PrP<sub>C</sub>, esistono alcuni polimorfismi in grado di condizionare la comparsa e il fenotipo della malattia (16).

Alla luce dell'importanza che ha assunto di recente tale gruppo di malattie, unitamente alla necessità che all'obbligo di denuncia attualmente prescritto dal vigente Regolamento di Polizia Veterinaria, facciano seguito interventi gestionali corretti, riteniamo che la forte carenza di dati sulla scrapie nel nostro Paese necessiti di essere colmata. In particolare, accanto alle informazioni di carattere epidemiologico, occorrono studi più approfonditi sulla patologia e sulla patogenesi della malattia naturale nonché sulle caratteristiche dei ceppi responsabili dell'infezione, da un lato, e sul genotipo dell'ospite naturale, dall'altro.

## CHARACTERIZATION OF THE HISTOPATHOLOGICAL PROFILE AND PrP<sup>Sc</sup> IMMUNOLocalIZATION IN NATURALLY OCCURRING CASES OF SCRAPIE IN SHEEP.

### Summary

The Authors describe the histomorphological pattern and GFAP- and PrP<sup>Sc</sup> immunolocalization in 25 CNS areas of 8 sheep with natural scrapie, which were originary from two herds in Northern Sardinia.

The histopathological pattern was very similar between the two animal groups. A marked spongiosis was found in subcortical areas (septum, nucleus caudatus) and in the diencephalon (thalamus, hypothalamus, mammillary bodies), while neuronal vacuolation was evident in the mesencephalon and medulla oblongata nuclei.

Astrocytosis was observed in all cases, particularly in the septum, thalamus, mesencephalon and medulla oblongata.

Immunohistochemically, PrP<sup>Sc</sup>, was detected both as cytoplasmatic fine granulations and as roundish inclusions, in the mesencephalon, pons and medulla oblongata neurons. PrP<sup>Sc</sup> was also immunolocalized among bundles of white matter fibers, in the brain stem. Unidentified, GFAP-negative cells, with a small central hyperchromatic nucleus, surrounded by PrP<sup>Sc</sup>-positive radiating branches, were observed in the same anatomic locations. A marked PrP<sup>Sc</sup>-immunoreactivity was also detected around blood vessels, with special reference to those of the white matter, as well as of subependimal and subpial districts.

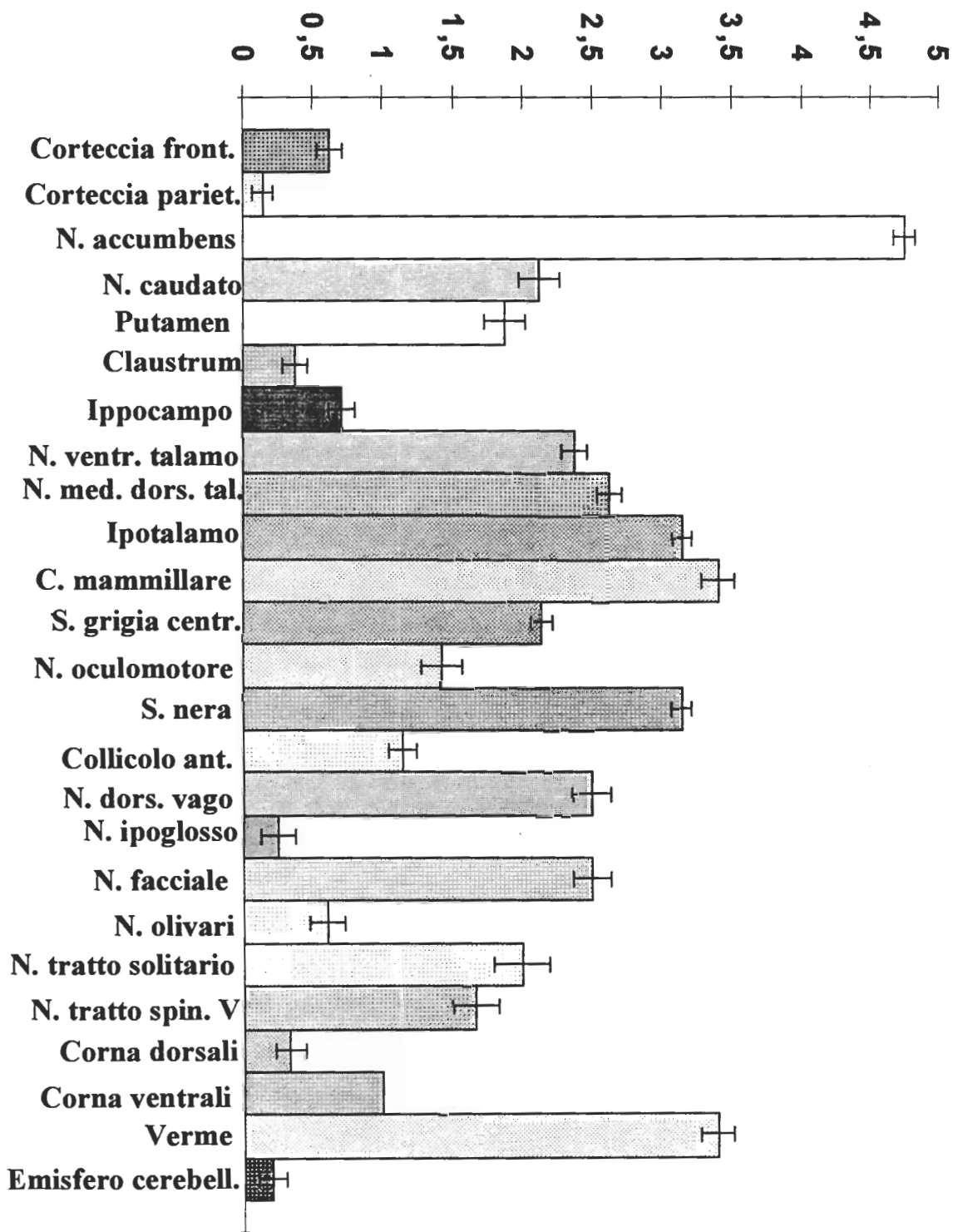
In conclusion, the clinical and pathological findings let us hypothesize the existence of one or more identical scrapie strains responsible for the two disease outbreaks.

**Key words:** scrapie, sheep, PrP<sup>Sc</sup>, immunohistochemistry.

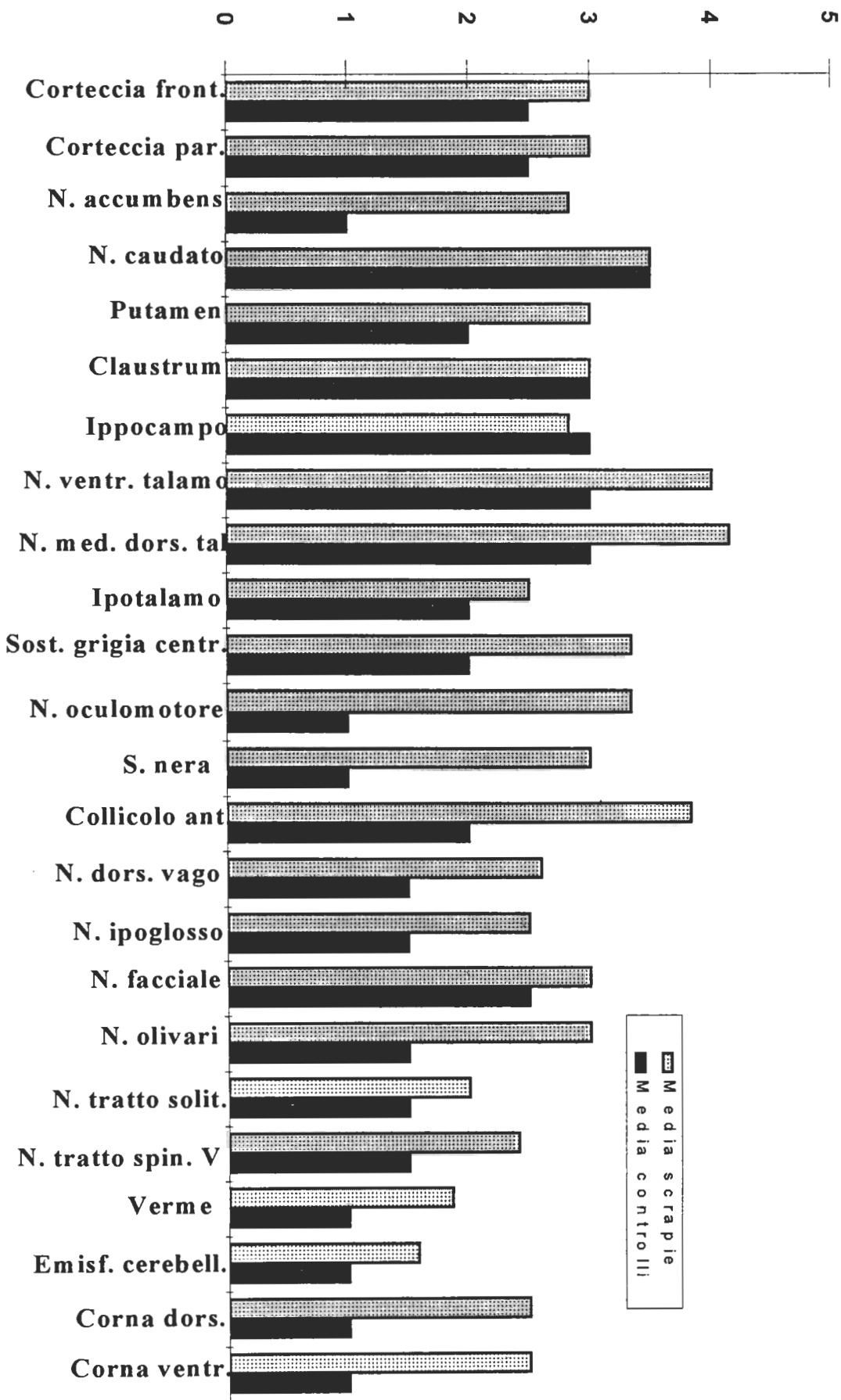
### BIBLIOGRAFIA

1. Pocchiari M. (1994). Prions and related neurological diseases. *Molec. Aspects. Med.* 15:195-291.
2. Pattison I.H., Millson G.C. (1961). Scrapie produced experimentally in goats with special reference to the clinical syndrome. *J. Comp. Pathol.* 71:101-108.
3. Bruce M.E., Fraser H. (1991). Scrapie strain variation and its implications. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 172:125-138.
4. Prusiner S. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216:136-144.
5. Detwiler L.A. (1992). Scrapie. In: Transmissible spongiform encephalopathies of animals. Rev. Sci. Tech. Office International des Epizooties vol. 11 pp. 491-537.
6. Fraser H. (1976). The pathology of natural and experimental scrapie. In Slow Virus Diseases of Animals and Man (R.H. Kimberlin, ed.). North-Holland, Amsterdam, 267-305.
7. Ligios C., Depalmas S., Agrimi U., Di Guardo G., Eleni C., Bitti G., Cardone F., Pocchiari M. Prima segnalazione di scrapie in Sardegna: rilievi clinici, epidemiologici e patologici. Atti Fe. Me. S. P. Rum. (1996) (in corso di stampa).

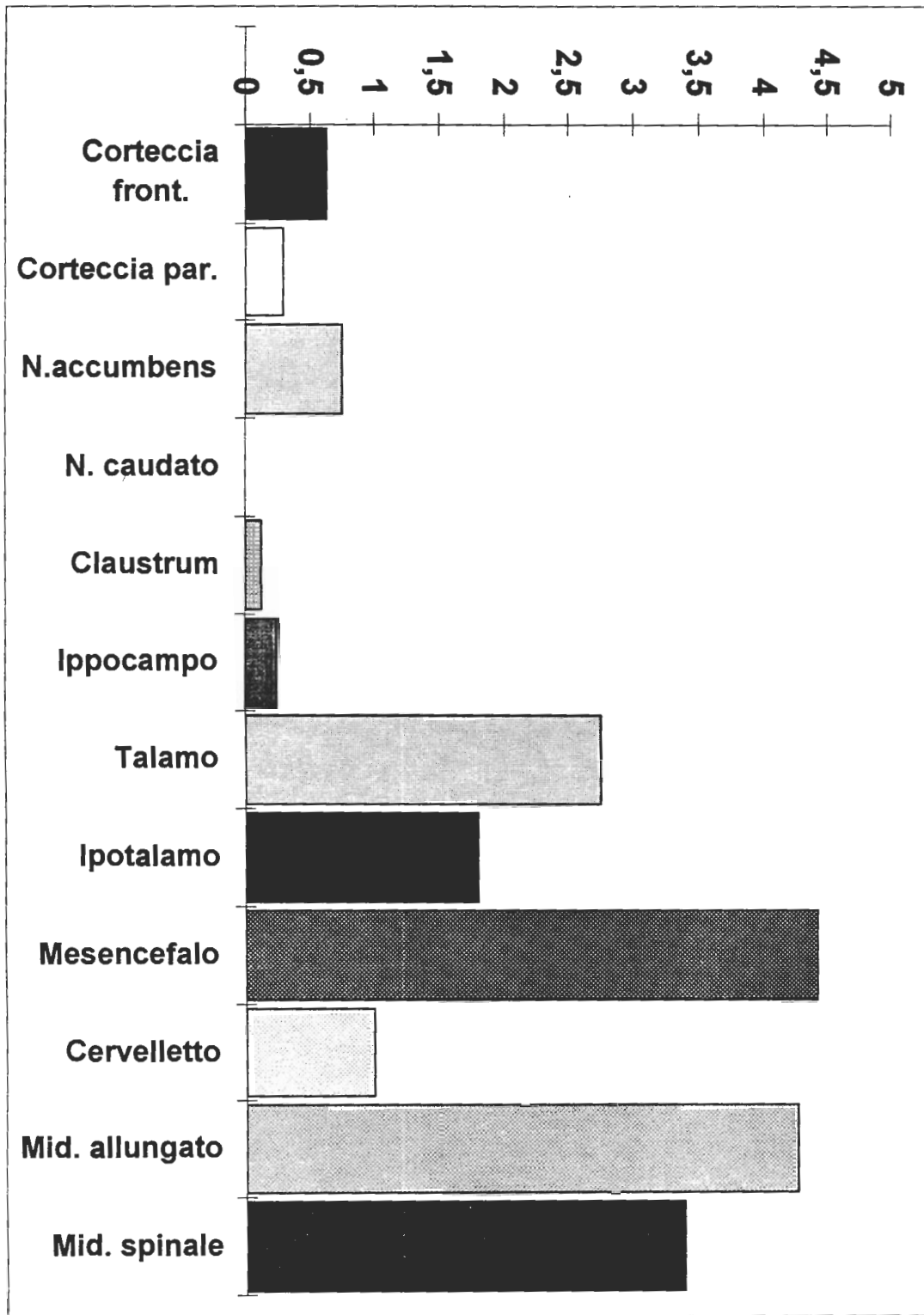
8. Haritani M., Spencer Y.I., Wells G.A.H. (1994). Hydrated autoclave pretreatment enhancement of prion protein immunoreactivity in formalin-fixed bovine spongiform encephalopathy-affected brain. *Acta Neuropathol.* 87:86-90.
9. Hadlow W.J. (1961). The pathology of experimental scrapie in the dairy goat. *Res. vet. Sci.* 2:289-318.
10. Williams E.S., Young S. (1993). Neuropathology of chronic wasting disease of mule deer (*Odocoileus hemionus*) and elk (*Cervus elaphus nelsoni*). *Vet. Pathol.* 30:36-45.
11. Fraser H., Dickinson A.G. (1968). The sequential development of brain lesions of scrapie in three strains of mice. *J. Comp. Pathol.* 78:301-311.
12. Hadlow W.J., Kennedy R.C., Race R.E. (1982). Natural infection of Suffolk Sheep with scrapie virus. *J. Infect. Dis.* 146:657-664.
13. Hadlow W.J., Kennedy R.C., Race R.E., Eklund M. (1980). Virologic and neurohistologic findings in dairy goats affected with natural scrapie. *Vet. Pathol.* 17: 187-199.
14. Cravero G., Guarda F., Dotta U., Guglielmino R. (1977). La "scrapie" in pecore di razza biellese. Prima segnalazione in Italia. *La Clinica Veterinaria* 100:1-14.
15. Georgsson G., Gísladóttir E., Àrnadóttir S. (1993). Quantitative assessment of the astrocytic response in natural scrapie of sheep. *J. Comp. Path.* 108:229-240.
16. Laplanche J.L., Chatelain J., Westaway D., Thomas S., Dussaucy M., Brugere-Picoux J., Launay J.M. (1993). PrP polymorphisms associated with natural scrapie discovered by denaturing gradient gel electrophoresis. *Genomics* 15:30-37.



**Fig. 1.** Valori medi attribuiti alla spungiosi ed alla vacuolizzazione neuronale di 25 aree del SNC in otto casi di scrapie ovina .



**Fig.2.** Valori medi attribuiti alla immunoreattività della GFAP di 25 aree del SNC in otto casi di scrapie ovina.



**Fig. 3.** Valori medi attribuiti alla immunoreattività nei confronti della PrP<sup>sc</sup> di 12 aree del SNC in otto casi di scrapie ovina.

# CARATTERIZZAZIONE IMMUNOISTOCHEMICA DELLE POPOLAZIONI CELLULARI PRESENTI IN CORSO DI GASTRITE DA *HELICOBACTER PYLORI* NEL CANE

Rossi G., Fortuna D.<sup>o</sup>, Ghiara P.\* , Renzoni G., Braca G., Taccini E.

Dipartimento di Patologia Animale Profilassi ed Igiene degli Alimenti - Pisa.

<sup>o</sup>Libero Professionista.

\*Chiron Vaccines S.p.a., Siena.

## Introduzione

*Helicobacter pylori*, batterio spiraliforme G-, colonizza la mucosa gastrica dell'uomo inducendo una flogosi cronica che determina con il tempo l'insorgenza di gastrite interstiziale cronica attiva, modificazioni metaplastico-displastiche dell'epitelio gastrico e atrofia della mucosa. Tali condizioni patologiche favoriscono l'insorgenza di erosioni-ulcere mucosali e persino modificazioni neoplastiche come MALT-omi o carcinomi gastrici. Vari modelli animali sono stati proposti per lo studio della patogenesi delle lesioni batterio-indotte e dei meccanismi immunopatologici che, in ordine temporale, rappresentano la base per lo sviluppo delle lesioni istopatologiche. Ad oggi, il modello animale più nuovo e rispondente sembra essere rappresentato dal Beagle xenobiotico (1). La presente ricerca prende in esame in ordine cronologico gli aspetti più caratteristici della flogosi gastrica indotta dalla infezione sperimentale del cane beagle xenobiotico con *H. pylori* tramite la caratterizzazione immunoistochimica delle sue diverse componenti cellulari e citochimiche.

## Materiali e Metodi

Tre cani Beagle di 4-6 mesi d'età (Morini s.a.s, S. Polo D'Enza, Italia), selezionati in base all'assenza di IgG sieriche individuabili in W.B. ed in ELISA nei confronti di *H. pylori* sono stati infettati come descritto in precedenza (1) con un ceppo di *H. pylori* SPM 326s adattato nel topo. I cani, osservati giornalmente dal punto di vista clinico hanno manifestato, nella prima settimana P.I. sintomi gastrointestinali quali vomito e diarrea. Esami endoscopici sono stati effettuati a 1, 2, 4, 8, 12, 18 e 24 settimane, tramite endoscopia ( Pentax pediatric-bronchoscope;

Pentax Technologies, Zaventem, Belgium) durante i quali è stato valutato l'aspetto macroscopico della mucosa gastrica e sono state prelevate biopsie, rispettivamente dalle regioni dell'antro, corpo, fondo e cardias, per effettuare il test dell'ureasi, esami microbiologici e biologico-molecolari nonché indagini istologiche ed immunoistochimiche. I campioni fissati in formalina tamponata al 10% ed inclusi in paraffina sono stati sezionati a 3µm di spessore per le indagini istopatologiche tramite colorazione con ematossilina-eosina ed alcian-PAS. Sezioni simili sono state utilizzate per indagini immunoistochimiche secondo le tecniche ABC-perossidasi e ABC-fosfatasi alcalina, usando come anticorpi primari: mAb anti Human IL-8 (Clone DM/C7, Genzyme Diagnostics, Cambridge MA), mAb anti Human Monocytes/Macophages ( Serotec Ltd, Oxford UK), mAb rat-anti Human CD3 ( Serotec Ltd), mAb rat-anti Canine CD4 (Serotec Ltd), mAb rat-anti Canine CD8 (Serotec Ltd.), mAb anti Canine CD21 (VMRD Inc., Pullman, WA) e mAb anti Canine neutrophils (VMRD Inc.), al fine di caratterizzare le differenti popolazioni cellulari rappresentanti la flogosi nella sua evoluzione. Le sezioni, precedentemente adese su vetrini pretrattati (Bio-Optica, Milano, Italy), sono state sottoposte, dopo deparaffinatura, ad un trattamento con forno a microonde a 650W per 10', utilizzando come tampone per l'immersione dei vetrini un tampone citrato 10mM a pH 6.0. Gli anticorpi secondari utilizzati sono stati Horse-anti mouse biotinilato e Rabbit-anti rat biotinilato (DAKO, Milano, Italy) e la reazione è stata sviluppata con 3-1-Diaminobenzidina (DAB) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) e, nel protocollo di doppia o tripla marcatura, il secondo cromogeno utilizzato è stato il VIP (Sigma) ed il terzo il Vector Red (Sigma), utilizzando per la controcolorazione nucleare il Methyl Green (Sigma).

## **Risultati**

L'esame endoscopico ed istologico della mucosa gastrica affettuato a tempo 0 era normale in tutti e tre i cani mentre, nelle sezioni provenienti dalle biopsie prelevate ad 1 settimana P.I., in concomitanza con la fase acuta e sintomatica dell'infezione, era possibile osservare una marcata iperemia ed edema della lamina propria mucosale, in particolare nel corpo e nell'antro. A questo periodo si osservava istologicamente un'antrite acuta caratterizzata da notevole infiltrazione di polimorfonucleati a livello della lamina propria intorno alle ghiandole che, in molti casi, apparivano fortemente

alterate. Un notevole numero di neutrofili era inoltre osservabile, anche tramite marcatura immunohistochimica, sparso sia subito al di sotto dell'epitelio che libero nel muco sovrastante, suggerendo fenomeni transcitosici attraverso l'epitelio stesso. Contemporaneamente, sparse cellule mononucleate e numerose cellule epiteliali delle cripte ghiandolari più profonde e maggiormente interessate dal fenomeno flogistico acuto manifestavano una chiara positività citoplasmatica per IL-8. L'aspetto istologico delle biopsie prelevate a due settimane P.I. denunciava un notevole decremento dei neutrofili e contemporaneamente l'aumento di mononucleati, per lo più linfociti CD3+ e rare plasmacellule.

La presenza di una popolazione linfocitaria CD3+ ed in prevalenza CD4+, diffusa e più abbondante nel corion interghiandolare nei campioni prelevati a 4 settimane PI, si accompagnava a chiari segni di erosione superficiale dell'epitelio. In particolare nell'antro la sofferenza epiteliale si manifestava tramite degenerazione vacuolare, picnosi e ressi nucleare nonché perdita della porzione apicale mucosecemente da parte delle cellule. In ottava settimana P.I. era osservabile, anche endoscopicamente, una caratteristica gastrite follicolare con aspetto "varioliforme" della mucosa che, istologicamente, presentava l'aspetto tipico della gastrite interstiziale con infiltrato cellulare di tipo linfocitario diffuso ora a banda e caratterizzato da elementi CD3+, oppure organizzato in strutture follicolari con porzione centrale costituita da linfociti CD21+ e porzione corticale da LT CD3+/CD4+. Nello stesso periodo si osservava la presenza di cellule macrofagiche con chiara positività citoplasmatica per le proteine di 35 e 53kda, tipiche di *H. pylori*. A partire dalla 12<sup>a</sup> settimana fino alla 24<sup>a</sup> si osservava una espansione delle strutture follicolari e, successivamente, una diffusione dell'infiltrato linfocitario in forma diffusa a tutto il corion, in particolare a livello dell'antro dove la presenza di neutrofili dispersi nell'infiltrato mononucleato suggeriva il tipico aspetto della flogosi cronico-attiva. In questa fase la popolazione linfocitaria risultava costituita oltre che da una maggioranza di cellule CD4+ anche da cellule CD8+ localizzate per lo più in posizione iuxta-ghiandolare o immediatamente sub-epiteliale. In questo stadio avanzato dell'infezione si evidenziava inoltre un marcato cambiamento nella popolazione delle mucine documentato tramite colorazione con alcian-PAS da una deplezione progressiva di cellule epiteliali PAS+ dell'antro.

## Discussione

L'infezione da *H. pylori*, al suo prodursi evoca una risposta flogistica aspecifica di tipo acuto e, successivamente, una risposta immunitaria di tipo cellulo-mediato che si rivela dinamicamente simile a quella indotta da altre noxae particolari quali *Mycobacterium spp.* e *Leishmania spp.*, del tutto inefficace nel debellare l'infezione stessa. La presenza di antigeni batterici quali quelli codificati dalla regione "cag" o isola di patogenicità (PAI) nonché di fattori chemiotattici presenti sia a livello epiteliale che trasportati nella lamina propria causano infatti il reclutamento e l'attivazione di cellule infiammatorie mediante l'attivazione diretta delle cellule del sistema immunitario e la secrezione di citochine proinfiammatorie da parte dell'epitelio danneggiato. Le osservazioni effettuate fino ad oggi sull'uomo sembrano confermate da quanto osservato nel cane sperimentalmente infetto in cui la stadiazione delle lesioni istopatologiche, se caratterizzata immunoistochimicamente, mostra una precoce fase in cui la flogosi acuta è caratterizzata dalla presenza di abbondante infiltrato di polimorfonucleati, in concomitanza con l'espressione da parte delle cellule epiteliali e di taluni mononucleati di IL-8. Questa chemochina prodotta da varie categorie cellulari agisce rallentando i neutrofili circolanti e facilita il loro passaggio attraverso l'endotelio capillare e la concentrazione nel focolaio di flogosi. L'IL-8 risulta inoltre un importante fattore di chemiotassi per i LT "naive" ossia non ancora differenziati in CD8+ o CD4+. Come osservato anche nell'uomo (2), nel cane l'infiltrazione precoce di neutrofili sembra mediata dalla produzione di questa chemochina poichè la sua presenza non è stata evidenziata nelle sezioni di biopsie prelevate prima dell'infezione o dopo la seconda settimana da essa. L'IL-8 risulta infatti essere specificatamente indotta dai prodotti derivanti da batteri appartenenti a ceppi di *H. pylori* citotossici (Tipo I) come quello utilizzato nell'infezione dei tre cani (3, 4). Nel cane sperimentalmente infetto si osserva come al cronicizzare dell'infezione, oltre alla comparsa di lesioni macro e microscopiche caratterizzate da erosione epiteliale e vacuolizzazione cellulare mediate soprattutto dalla citotossina *VacA* di *H. pylori*, vi sia una progressiva infiltrazione di cellule mononucleate di tipo T /CD3+. Tale infiltrazione indica un tentativo di risposta cellulo-mediata specifica in aggiunta alla risposta umorale, mucosale e sistemica, parzialmente inefficace che culmina con la strutturazione di questo infiltrato in veri e propri follicoli linfoidi similmente a quanto descritto negli stadi cronici di infezione da *H. spp.* nell'uomo (5,

6) e negli animali infetti spontaneamente o sperimentalmente (7-9). Queste strutture linfoide organizzate (area centrale CD21+ ed area corticale CD3+/CD4+) possono quindi ritenersi conseguenti ad una stimolazione persistente del sistema immunitario con reclutamento “in situ” di LT specifici (10). E’ stato inoltre descritto più volte in campo umano come in alcuni individui tali strutture linfoide gastriche precedano lo sviluppo di veri e propri B-linfomi o MALT-omi (11). Il modello canino può quindi aprire nuove prospettive anche per lo studio del ruolo dell’infezione cronica da *H. pylori* nell’eventuale determinismo dello sviluppo di patologia neoplastica.

I risultati della caratterizzazione dei linfociti T infiltranti (per lo più LT CD3+/CD4+) concordano inoltre con recenti acquisizioni secondo le quali in corso di gastrite antrale *H. pylori*-associata siano le stesse cellule mucosali ad esprimere sulla loro membrana molecole appartenenti alla classe II del sistema maggiore di istocompatibilità (MHCII) assumendo il ruolo tipico delle cellule dendriche di cellule “presentanti l’antigene” (APC). Tale presentazione induce la proliferazione specifica dei LT CD4+ che a loro volta risultano suddivisi in Th1 e Th2. Il fatto che l’infezione sperimentalmente con *H. pylori* nel cane induca una risposta umorale caratterizzata per lo più da IgG 1 ma soprattutto da IgG2a (1) similmente a quanto osservato anche nel topo infettato con *H. felis* o con *H. pylori* (12) o nell’uomo infetto e con gastroduodenopatia, porta a pensare che l’infezione si traduca in una attivazione predominante dei LT CD4+/Th1. Quest’ultima categoria di cellule risulta essere maggiormente rivolta verso l’induzione alla produzione di citochine proinfiammatorie (6) venendo, in definitiva, ad aumentare il danno tissutale. Ciò giustifica la ricerca di nuove “presentazioni” degli antigeni di *H. pylori* che, somministrate, evocano una risposta CD4+ maggiormente diretta nella selezione di cellule Th2 correlate con la produzione di anticorpi capaci di conferire protezione all’ospite. In conclusione, il cane beagle xenobiotico infettato con *H. pylori* di Tipo I risulta un buon modello per lo studio delle patologie gastroduodenali *H. pylori*-indotte in quanto mima numerosi aspetti clinici nonché, dal punto di vista istopatologico, ripropone con notevole fedeltà gli eventi della flogosi acuta e cronica con selezione delle stesse popolazioni cellulari tipiche della risposta cellulo-mediata dell’uomo. Ciò che appare più interessante di questo modello è la possibilità di seguire la “storia istopatologica” dell’infezione con la relativa caratterizzazione dei fattori umorali e cellulari che la identificano aprendo

nuove vie per lo studio delle patologie *H. pylori*-indotte e dei presidi immunizzanti da usare anche in campo umano.

### **Bibliografia**

- 1) Rossi G, Fortuna D, Sozzi S, Renzoni G, Taccini E: Histopathological and immunohistochemical staging of *Helicobacter pylori* lesions induced in experimentally infected xenobiotic dogs. Proc.15th Meet. Europ. Soc. Vet. Pathol, 90, 1997.
- 2) Crabtree JE, Peichl P, Wyatt JJ, Stachl U, Lindley IJ: Gastric interleukin-8 and IgA IL-8 autoantibodies in *H. pylori* infection. Scand J Immunol 37: 65-70, 1993.
- 3) Ando T, Kusugami K, Ohsuga M, Shinoda M, Sakakibara M, Saito H, Fukatsu A, Ichiyama S, Ohta M: Interleukin-8 activity correlates with histological severity in *H. pylori*-associated antral gastritis. Am J Gastroenterol 91: 1150-1156, 1996.
- 4) Uemura N, Oomoto Y, Mukai T, Okamoto S, Yamaguchi S, Mashiba H, Taniyama K, Sasaki N, Sumii K, Haruma K, Kajihama G: Gastric corpus IL-8 concentration and neutrophil infiltration in duodenal ulcer patients. Aliment Pharmacol Ther 11: 793-800, 1997.
- 5) Genta RM, Hamner HW, Graham DY: Gastric lymphoid follicles in *H. pylori* infection: frequency, distribution, and response to triple therapy. Hum Pathol 24: 577-583, 1993.
- 6) Owen DA: The morphology of gastritis. Yale J Biol Med 69: 51-60, 1996.
- 7) Fox JC, Batchelder M, Marini R, Yan L, Handt L, Li X, Chames B, Hayward J, Campbell J, Murphy JC: *Helicobacter pylori* induced gastritis in the domestic cat. Infect Immun 63: 2674-2681, 1995.
- 8) Handt LK, Fox JG, Stalis IH, Rufo R, Lee J, Lin J, Li X, Kleantous H: Characterization of feline *Helicobacter pylori* strains and associated gastritis in a colony of domestic cats. J Clin Microbiol 33: 2280-2289, 1995.
- 9) Radin MJ, Eaton KA, Krakowka S, Morgan DR, Lee A, Otto G, Fox J: *Helicobacter pylori* gastric infection in gnotobiotic beagle dogs. Infect Immun 58: 2606-2612, 1990.
- 10) Hussell T, Isaacson PG, Crabtree JE, Spencer J: *Helicobacter pylori*-specific tumor infiltrating T cells provide contact dependent help for the growth of malignant B cells in low-grade gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. J. Pathol. 178:122-127, 1996.
- 11) Parsonnet JS, Hansen S, Rodriguez L, Gelb AB, Warnke RA, Jellum E, Orentreich N, Vogelstein JH, Friedman GD: *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. N Engl J Med 330: 1267-1271, 1994.

12) Mohammadi M, Czinn S, Redline R, Nedrud J: *Helicobacter* specific cell-mediated immune responses display a predominant Th1 phenotype and promote a delayed-type hypersensitivity response in the stomachs of mice. J Immunol 156:4729-4738, 1996.

*\*La ricerca è stata realizzata con fondi di Ateneo*

## **OSTEOPATIA EREDITARIA IN CUCCIOLO DI PASTORE MAREMMANO-ABRUZZESE. NOTA PRELIMINARE**

Mazzullo G.<sup>1</sup>, Macrì B.<sup>1</sup>, Carlo Stella N.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Istituto di Patologia Generale e Anatomia Patologica Veterinaria – Università di Messina*

<sup>2</sup> *Clinica Ostetrica e Ginecologica – Policlinico Universitario – Messina*

### **Introduzione**

Le displasie scheletriche rappresentano un gruppo eterogeneo di disordini ereditari del tessuto connettivo che provocano anomalie nella dimensione e nella forma degli arti, del tronco e del cranio, alterando la normale crescita ossea o il rimodellamento osseo.

Vengono frequentemente classificate, secondo il sito del difetto anatomico, in epifisarie, metafisarie e diafisarie.

Le stesse possono essere ulteriormente differenziate secondo il contemporaneo coinvolgimento delle ossa craniche o del rachide (displasie cranio- o spondilo-epifisarie, displasie spondilo-metafisarie).

Quelle caratterizzate da un insufficiente sviluppo cartilagineo costituiscono le condrodisplasie; le stesse sono state riscontrate in diverse specie di animali domestici e di laboratorio; la causa della loro insorgenza è frequentemente correlata ad una anomalia della matrice cartilaginea (proteine non-collagene, anormale organizzazione del collagene di tipo-II, anormale metabolismo dei proteoglicani).

L'(osteo)condrodisplasia frequentemente genera forme di nanismo disproporzionato, in cui l'apposizione e l'espansione interstiziale della cartilagine contribuiscono all'ispessimento e allo slargamento della superficie di accrescimento delle ossa. Il nanismo si manifesta frequentemente alla nascita; gli animali possono essere nati morti o vivere per un breve periodo. Occasionalmente, la condrodisplasia può apparire tardivamente nella vita dei soggetti affetti (Woodard, 1997).

Una particolare forma di condrodisplasia è rappresentata dall'acondroplasia, in cui, oltre ai difetti di sviluppo scheletrici, si riscontrano sempre anomalie cranio-facciali. Il cosiddetto nanismo acondroplastico è caratterizzato da anomalie di proporzione tra gli arti ed il resto del corpo. I primi sono corti, sovente incurvati e con le estremità epifisarie grosse e protudenti; la testa è spesso ingrandita, mentre il corpo può presentare dimensioni più o meno normali (Pelagalli, 1982).

Al fine di contribuire alla conoscenza delle suddette alterazioni nella specie canina, abbiamo ritenuto interessante presentare il caso seguente, anche perché, dalla disamina della bibliografia sull'argomento, non risultano analoghe segnalazioni in soggetti di razza Pastore Maremmano-Abruzzese.

### **Materiali e metodi**

La nostra osservazione riguarda un esemplare femmina, di 11 mesi circa di età, che faceva parte di una cucciolata composta da 7 elementi (2 maschi e 5 femmine), nati da parto eutocico da una cagna di circa 3 anni d'età, al primo accoppiamento.

Dei 7 cuccioli, uno, di sesso femminile e nato morto, presentava alterazioni somatiche, quali macrosomia, anormalità sia cranio-facciali che a carico dei quattro arti e ipotricosi.

Per quanto riguarda gli altri cuccioli, solo in prossimità del primo mese di vita in tre soggetti (due femmine ed un maschio) si evidenziava uno scarso incremento ponderale rispetto ai fratelli.

In particolare, il soggetto in questione presentava difficoltà nella deambulazione e nel mantenimento della stazione quadrupedale, soprattutto sul treno posteriore, dove gli arti si presentavano corti e deviati.

L'esame radiologico, effettuato al 43° giorno d'età, evidenziava, in proiezione ventro-dorsale diretta, una netta alterazione anatomica di tutte le ossa del treno posteriore. Le ossa lunghe apparivano accorciate e deformi, con evidente "svasamento" delle epifisi prossimali e distali. In tutte le componenti ossee era presente l'ombra del tessuto condroide non ancora ossificato. Più segnatamente, le ossa del tarso presentavano nuclei di ossificazione dispersi in un tessuto cartilagineo. Le ossa del bacino erano accorciate, slargate e non ancora fuse. Alterazioni analoghe si apprezzavano anche a livello del rachide.

Gli esami di laboratorio evidenziavano un alterato rapporto Ca:P, a favore del secondo; altre indagini risultavano nella norma.

Le condizioni generali peggioravano con l'avanzare dell'età, con la comparsa di cifo-scoliosi, accentuato brachignatismo superiore e deformità del cranio tali da renderlo simile a quello di un bull-dog, crescente ipofunzionalità dell'arto posteriore destro e deformità sempre più accentuate a carico di tutti gli arti. Il quadro veniva

aggravato dalla comparsa di numerose piaghe da decubito, localizzate soprattutto nelle parti caudali del corpo. Ciò nonostante, l'appetito e il sensorio rimanevano sempre nella norma.

All'età di 11 mesi circa, il controllo radiologico rivelava le simmetriche deformità di tutti i segmenti ossei precedentemente descritti. L'aumento volumetrico era evidente, così come le deformazioni sia lungo l'asse maggiore, che, soprattutto, a livello delle epifisi, le quali apparivano schiacciate e fortemente slargate; esistevano i segni della chiusura delle cartilagini di accrescimento, per altro non ancora completa.

Un improvviso decadimento delle condizioni generali, unitamente a disturbi gastro-enterici, urinari e respiratori, tutti ribelli a qualsiasi trattamento farmacologico, portavano a morte il soggetto nello spazio di pochi giorni.

Durante l'esame necroscopico campioni di vari organi interni, unitamente ai quattro arti, al cranio e al rachide, venivano prelevati e fissati in formalina al 10%. Porzioni dei segmenti ossei interessati erano quindi precedentemente sottoposte a decalcificazione mediante acido nitrico al 5%, incluse in paraffina e successivamente, le sezioni da esse ottenute, colorate con Ematossilina-Eosina, Tricromica di Masson e Alcian-PAS.

## **Risultati**

L'autopsia, oltre alle evidenti alterazioni scheletriche, ci permetteva di mettere in risalto alcune lesioni macro e microscopicamente rivelabili in altri organi e apparati che, al fine di non stornare l'attenzione dall'oggetto della presente comunicazione, desideriamo riportare nella pubblicazione in estenso del lavoro.

L'esame particolareggiato di alcuni distretti articolari, infatti, rivelava la presenza di un piartro a livello coxo-femorale, più marcato a sinistra, mentre tutte le ossa lunghe si presentavano accorciate, deformate lungo gli assi maggiori e con ampie superfici di accrescimento, soprattutto a livello degli arti anteriori; anche i carpi ed i tarsi, sebbene in misura inferiore, mostravano simili deformità. In sezione, lo spessore dell'osso era pressoché normale. A carico delle estremità prossimali si apprezzava una caratteristica forma "a trombetta" o "a fungo", dove la sostanza spugnosa appariva apparentemente più porosa.

L'esame istologico, condotto sui vari segmenti ossei, rivelava, in tutte le sezioni, un assottigliamento del piatto epifisario, con vistosa riduzione numerica delle cellule

cartilaginee, soprattutto a carico delle porzioni epifisarie. L'organizzazione colonnare dei condrociti appariva estremamente limitata, tanto da assumere carattere quasi abortivo, apparendo come nidi cellulari separati da ampie aree di matrice. Le trabecole ossee, al di sotto del piatto epifisario, erano drasticamente diminuite di volume e quantità e assumevano un arrangiamento pressoché orizzontale.

## **Discussione**

L'osservazione dei quadri macroscopici ed istologici, soprattutto a carico della componente ossea, unitamente ai dati clinici e radiologici, deponevano per una diagnosi di nanismo acondroplasico.

Premesso che le malformazioni generalizzate delle ossa, così come tutti gli altri tipi di anomalie di sviluppo, rivestono una considerevole importanza negli animali, sia da un punto di vista zoo-economico, sia dal punto di vista della salute degli stessi, particolarmente interessante risulta, nel caso fin qui descritto, il periodo di sopravvivenza del cucciolo, relativamente lungo rispetto ai dati riportati in bibliografia (Hoskins, 1997; Woodard,1997), secondo i quali, addirittura, molti feti muoiono in utero o ben presto in epoca neonatale; inoltre il parto risulta prematuro, contrariamente a quanto avvenuto nel nostro caso. Ad ulteriore conferma di quanto detto, segnaliamo che gli altri fratelli affetti dalla malformazione sono tuttora in vita.

Il riconoscimento dei difetti congeniti, associato alla pianificazione degli accoppiamenti o all'esclusione dalla riproduzione degli animali colpiti, può consentire di eliminare molte condizioni indesiderabili.

Dalla disamina della bibliografia sull'argomento e da contatti avuti con associazioni cinofile, tale malformazione non risulta a tutt'oggi segnalata nei cani da Pastore Maremmano-Abruzzese.

I risultati delle analisi del "pedigree" del soggetto, delle piastre cromosomiche, per l'evidenziazione di eventuali anomalie, e le modificazioni riscontrate nei vari parenchimi, saranno oggetto di una ulteriore conclusiva pubblicazione.

## **Bibliografia**

- 1) AA.VV.: Patologie ereditarie e congenite del cane e del gatto. Summa, Le Point Veterinaire SRL, Milano, Italia, 1997.

- 2) Breur GJ, Zerbe CA, Slocombe RF, Padgett GA, Braden TD: Clinical, radiographic, pathologic, and genetic features of osteochondrodysplasia in Scottish Deerhounds. *JAVMA*, **195**, 606-612, 1989.
- 3) Bingel SA, Sande RD: Chondrodysplasia in five Great Pyrenees. *JAVMA*, **205**, 845-848, 1994.
- 4) Camera G: Le osteocondrodisplasie genetiche letali. Atti del terzo incontro sarnese di pediatria – Patologia congenita: Attualità e problematica. Vietri sul mare, 20-21 Marzo 1981, 93-115.
- 5) Fletch SM, Smart ME, Pennock PW, Subden RE: Clinical and pathologic features of chondrodysplasia (dwarfism) in the Alaskan Malamute. *JAVMA*, **162**, 357-361, 1973.
- 6) Hoskins JD: I difetti congeniti del gatto. *Veterinaria*, anno 11, n.3, 87-97, 1997.
- 7) Mather GW: Achondroplasia in a litter of pups. *JAVMA*, **128**, 327-328, 1956.
- 8) Newton CD, Siemering G: Malattie dello scheletro. In: Ettinger SJ: *Trattato di medicina interna veterinaria. Malattie del cane e del gatto*, vol. II, 2235-2259, Edizioni SBM, Noceto, Parma, Italia, 1988.
- 9) Palmer N: Bones and joints. In: Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N: *Pathology of domestic animals*, vol. 1, fourth ed., 26-37, Academic Press, 1993.
- 10) Pelagalli G: Embriologia e teratologia. Idelson, Napoli, 189-190, 1982.
- 11) Woodard JC: Skeletal system. In: Jones TC, Hunt RD, King NW: *Veterinary Pathology*, sixth ed., 908-911, 1997.

# ALTERAZIONI METABOLICHE IN ERITROCITI DI CANI ANEMICI

S. Paltrinieri, F. Agnes, S. Comazzi

*Istituto di Patologia Generale Veterinaria - Milano*

## Introduzione

In letteratura sono riportate rare segnalazioni sull'attività metabolica di eritrociti di cane in corso di anemia, per lo più riferite a forme rigenerative (Smith e Agar, 1975; Lubas *et al.*, 1979; Romanello, 1980): in casi di anemia emolitica, oltre alla concentrazione di 2,3 DPG, aumenta l'attività degli enzimi piruvato kinasi (PK), indicatore del metabolismo in generale, e glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PDH), che permette una maggiore produzione di NADPH, indispensabile per i sistemi anti-ossidativi eritrocitari; (Paltrinieri *et al.*, 1996). Ancor più rare e incomplete sono le segnalazioni relative a forme non rigenerative (King *et al.*, 1992). Per tali motivi si è voluto verificare il comportamento metabolico di globuli rossi di cani anemici, analizzando comparativamente anemie di diversa origine ed includendo nel protocollo sperimentale la valutazione della resistenza globulare e dell'indice di produzione reticolocitaria (RPI), sia per meglio inquadrare la fisiopatologia dei singoli casi di anemia, sia per una loro valutazione comparativa.

## Materiali e metodi

Sono stati esaminati campioni di sangue prelevati da 22 cani di età sesso e razza differenti, affetti da anemia. Il sangue, posto in provette contenenti sodio eparina e trasportato in borsa termica, è stato analizzato entro 2 ore dal prelievo. Quali valori di riferimento sono stati utilizzati 10 cani di età, sesso e razza differenti privi di alterazioni ematologiche riferibili a stati anemici, esaminati durante lavori precedenti (Paltrinieri *et al.*, 1996, Paltrinieri *et al.*, 1998).

Ematologia: sono stati valutati il conteggio degli eritrociti e dei leucociti mediante analizzatore automatico (Coulter Counter ZF), la concentrazione dell'emoglobina con metodo di Drabkin (Haemoglobinometer), il microematocrito (Haemofuge A), gli indici eritrocitari di Wintrobe (MCV, MCH, MHCH) come indicato da Jain (1986) e la formula leucocitaria su striscio colorato con May Grünwald Giemsa. È stata infine

valutata la percentuale di reticolociti dopo colorazione con blu brillante di cresile (Pasquinelli, 1984) ed è stato calcolato l'Indice di Produzione Reticolocitaria (RPI) come proposto da Jain (1993).

2,3DPG - per il dosaggio del 2,3DPG è stato utilizzato un kit disponibile in commercio (Sigma) con valutazione spettrofotometrica a 340 nm contro acqua in spettrofotometro Beckman (mod. 25).

PK e G6PDH - L'attività degli enzimi PK e G6PDH è stata valutata utilizzando kit disponibili in commercio (Boehringer Mannheim) con determinazione spettrofotometrica contro acqua a 340 nm.

Fragilità osmotica – E' stata seguita la metodica di Dacie e Lewis, descritta da Pasquinelli (1984), allestendo diluizioni scalari (da 0,9% a 0,1%) di NaCl, aggiungendo ad ogni provetta 50 µl di sangue e misurando spettrofotometricamente (540 nm contro acqua), dopo centrifugazione, la concentrazione di emoglobina nel surnatante. Dai valori ottenuti in ogni campione sono state elaborate statisticamente (curva sigmoideale dose-risposta) le curve di emolisi cumulativa e derivativa. Lo stesso metodo statistico ha permesso di ricavare i valori di emolisi minima (meno del 5% di emolisi) media (più del 50% di emolisi) e massima (più del 90% di emolisi).

Analisi statistica – Per l'analisi statistica è stato utilizzato il software SPSS 6.1.2.

## **Risultati**

L'eritrogramma degli animali anemici evidenzia valori inferiori rispetto ai controlli per quanto riguarda il numero di eritrociti ( $P<0,001$ ), la concentrazione emoglobinica ( $P<0,001$ ), ed il valore ematocrito ( $P<0,001$ ), una maggiore percentuale di reticolociti ( $P<0,01$ ) ed un più alto RPI ( $P<0,05$ ): quest'ultimo parametro, però, presentava un valore medio inferiore ad 1, valore che viene ritenuto utile in medicina veterinaria per distinguere le anemie in rigenerative e non rigenerative (Jain, 1993). Si è quindi ricorsi ad una valutazione analitica di tale parametro, suddividendo poi gli animali anemici in due gruppi in funzione della risposta midollare. (Tab. 1)

Al gruppo delle anemie non rigenerative appartengono essenzialmente forme croniche, con l'eccezione dei quattro casi di piroplasmosi, mentre tra le anemie rigenerative rientrano quasi esclusivamente forme acute, ed in particolare casi di

anemia emolitica, caratterizzati da un ben preciso corredo sintomatologico (febbre, emoglobinuria, anemia ed ittero) e da reperti di intensa risposta midollare.

<i>Anemie rigenerative</i>			<i>Anemie non rigenerative</i>		
N°	Patologia	RPI	N°	Patologia	RPI
1	Anemia emolitica	1,18	7	Leucemia mieloide acuta (AML5)	0,07
2	Anemia emolitica	3,08	9	Piroplasmosi	0,76
3	Anemia emolitica	2,03	12	Piroplasmosi	0,05
4	Cardiopatìa	1,04	13	Emorragia cronica (emangiosarcoma)	0,19
5	Anemia Emolitica Autoimmune	1,28	14	Anemia ipoplastica	0,22
6	Sindrome della vena cava	1,35	16	Large Granular Leukemia	0,04
8	Flogosi purulenta cronica	1,42	17	Emorragia cronica (emangiosarcoma)	0,26
10	Anemia emolitica	2,53	19	Anemia ipoplastica	0,16
11	Anemia Emolitica Autoimmune	2,01	20	Piroplasmosi	0,12
15	Piroplasmosi	1,85	21	Piroplasmosi	0,28
18	Emorragia acuta (trauma)	1,64	22	Ehrlichiosi	0,08

Tabella 1: Suddivisione dei casi di anemia in base all'indice di produzione reticolocitaria

La rilettura dei dati ottenuti in funzione della suddivisione in tre gruppi (Controlli, Anemie Non Rigenerative e Anemie Rigenerative) ha delineato differenze più nette nell'eritrogramma (tab. 2). Permangono differenze significative ( $P < 0,001$ ) per quanto riguarda numero di eritrociti totali, concentrazione di emoglobina e valore ematocrito, con valori inferiori nei due gruppi di animali anemici rispetto a quelli di controllo: gli animali con anemia rigenerativa, inoltre, manifestano valori molto più elevati di quelli degli altri due gruppi per quanto riguarda numero di eritroblasti ( $P < 0,05$ ), percentuale di reticolociti ( $P < 0,001$ ), ed MCV ( $P < 0,05$ ): Invece l'MCHC risulta significativamente ridotto ( $P < 0,001$ ). Le anemie non rigenerative quindi appaiono come normocromiche normocitiche, e quelle rigenerative come ipocromiche macrocitiche, in accordo con quanto riportato in letteratura (Jain, 1986; Jain, 1993).

	Eritrociti x 10 <sup>6</sup> /μl	Eritroblasti x 10 <sup>6</sup> /μl	Reticolociti (%)	RPI	Hb (g/dl)	Ht (%)	MCV (fl)	MCHC (%)	MCH (pg)
C	7,49 ± 0,87	0,05 ± 0,12	0,91 ± 0,53	0,24 ± 0,14	18,9 ± 1,7	51,5 ± 4,2	69,2 ± 5,3	36,8 ± 1,6	25,4 ± 1,5
AN	3,24 ± 0,77	0,16 ± 0,33	1,17 ± 1,25	0,20 ± 0,20	8 ± 1,9	22,6 ± 5,9	69,9 ± 11	35,7 ± 2,6	24,8 ± 2,5
AR	2,87 ± 0,91	4,81 ± 7,46	10,06 ± 3,77	1,76 ± 0,62	7,6 ± 1,9	24,1 ± 5,8	93,1 ± 37,5	31,8 ± 3,8	29,5 ± 12,3
	***	*	***	***	***	***	*	***	n.s.
	C vs AN, AR	AR vs AN, C	AR vs AN, C	AR vs AN, C	C vs AN, AR	C vs AN, AR	AR vs AN, C	AR vs AN, C	-

Tabella 2: Valori relativi all'eritrogramma rilevati negli animali di controllo (C), ed in quelli con anemia non rigenerativa (AN) e rigenerativa (AR)

Per quanto riguarda il metabolismo eritrocitario (Tab. 3), nelle forme rigenerative l'attività della PK è più alta rispetto ai controlli ( $P < 0,001$ ), ed alle forme non rigenerative ( $P < 0,01$ ), che, pur presentando un valore medio più alto di quello dei controlli, non ne differiscono in maniera significativa, anche a causa dell'alta variabilità individuale. Per quanto riguarda l'attività della G6PDH non sono state rilevate differenze tra i due gruppi di animali anemici, che presentano entrambi valori medi più elevati rispetto a quello dei controlli ( $P < 0,01$ ). Lo stesso dicasi a proposito della concentrazione di 2,3DPG, con una maggiore significatività statistica ( $P < 0,001$ ). A questo proposito va rilevata l'importanza della presenza di elementi eritroidi immaturi nel determinare le variazioni sopradescritte: infatti è stato possibile rilevare correlazioni positive dell'attività della PK con il numero di eritroblasti ( $P < 0,01$ ,  $r = 0,52$ ) e di reticolociti ( $P < 0,05$ ,  $r = 0,52$ ) e negativa con il numero di eritrociti ( $P < 0,001$ ,  $r = -0,69$ ); l'attività della G6PDH, invece non è risultata positivamente correlata con gli elementi immaturi, mentre è stato possibile evidenziare una correlazione negativa con gli eritrociti totali ( $P < 0,001$ ,  $r = -0,67$ ).

	PK (U/g Hb)	G6PDH (U/g Hb)	2,3 DPG ( $\mu\text{mol/g Hb}$ )	Resistenza globulare minima (% Na Cl)	Resistenza globulare media (% Na Cl)	Resistenza globulare massima (% Na Cl)
C	2,15 $\pm 1,33$	2,34 $\pm 1,01$	15,00 $\pm 1,19$	0,560 $\pm 0,175$	0,451 $\pm 0,102$	0,374 $\pm 0,099$
AN	12,53 $\pm 8,61$	9,16 $\pm 3,90$	19,67 $\pm 4,04$	0,704 $\pm 0,044$	0,420 $\pm 0,075$	0,218 $\pm 0,044$
AR	21,43 $\pm 15,06$	9,30 $\pm 6,26$	21,43 $\pm 4,37$	0,728 $\pm 0,078$	0,438 $\pm 0,101$	0,228 $\pm 0,071$
	***	**	***	***	n.s.	***
	AR vs C	C vs AN, AR	C vs AN, AR	AR vs C	-	C vs AN, AR
	**			**		
	AR vs AN			AN vs C		

Tabella 3: Valori relativi all'attività di PK e G6PDH, alla concentrazione di 2,3 DPG ed alla fragilità osmotica rilevati negli animali di controllo (C), ed in quelli con anemia non rigenerativa (AN) e rigenerativa (AR)

La concentrazione di 2,3DPG, infine, è risultata correlata negativamente con il numero di eritrociti ( $P < 0,001$ ,  $r = -0,66$ ), mentre è emersa solo una modica correlazione con il numero di eritroblasti ( $P < 0,05$ ,  $r = 0,4$ ), a conferma del fatto che, indipendentemente dall'attività rigenerativa, in condizioni di anemia aumenta la

necessità di ossigeno dell'organismo. L'analisi della fragilità osmotica ha evidenziato una minore resistenza globulare minima e una maggiore resistenza globulare massima nei soggetti anemici rispetto ai controlli ad indicare da un lato una maggiore fragilità eritrocitaria, dall'altro la presenza di una sottopopolazione di eritrociti più resistente, presumibilmente costituita da elementi giovani e/o immaturi, che, come è noto, sono più resistenti alla lisi osmotica (Jain, 1993): ciò ha anche permesso di rilevare alterazioni della caratteristica forma sigmoide delle curve cumulative e due o più picchi di emolisi nelle curve derivate dei fragiligrammi.

## **Conclusioni**

L'analisi dei risultati ottenuti indica, ai fini di un migliore inquadramento dello stato anemico, l'importanza di effettuare, oltre al routinario esame emocromocitometrico, la valutazione di parametri aggiuntivi. A tale proposito i parametri che meritano di essere presi maggiormente in considerazione sono la percentuale e il numero dei reticolociti, che consente di ricavare l'RPI, indice indispensabile per ottenere una corretta suddivisione in forme rigenerative e non rigenerative. La valutazione del metabolismo eritrocitario attraverso la determinazione di attività enzimatiche quali la PK, G6PDH, ha permesso di evidenziare come in tutti gli stati anemici, indipendentemente dalla causa di anemia, gli eritrociti si trovino in condizioni di aumentare il proprio metabolismo; tale incremento è più marcato nelle forme rigenerative in funzione della presenza di elementi giovani e/o immaturi. Non è invece rilevabile alcuna differenza tra anemie rigenerative e non rigenerative nella concentrazione di 2,3DPG in relazione alla sua specifica funzione. Infine lo studio della fragilità osmotica e delle curve derivativa e cumulativa del fragiligramma ha reso possibile l'evidenziazione di quadri tipici delle forme rigenerative.

In conclusione, nonostante i risultati ottenuti siano di per sé utili a definire gli aspetti di fisiopatologia eritrocitaria in corso di anemia, si ritiene comunque indispensabile uno studio dinamico da condurre attraverso una serie di prelievi in varie fasi di insorgenza, decorso e remissione dello stato anemico. Un'indicazione in tal senso viene fornita in modo paradigmatico dai casi osservati di piroplasmosi, dei quali uno ha fornito un quadro di anemia rigenerativa, quattro invece sono classificabili come anemia non rigenerative probabilmente in relazione ad una diagnosi più precoce.

## **Bibliografia**

- 1) Jain NC: Scham's Veterinary Hematology . 4<sup>th</sup> Edition, Lea & Febiger, Philadelphia, 1986
- 2) Jain NC: Essential of Veterinary Haematology. Lea & Febiger, Philadelphia, 1993
- 3) King LC, Giger V, Diserens D, Nagode LA: Anemia of chronic renal failure in dogs. J. Int. Med., **6**:264-270, 1992
- 4) Lubas GJ, Della Croce G, Buonaccorsi A, Delgadillo AJ: Il comportamento di alcuni enzimi e metaboliti eritrocitari in diversi processi morbosi del cane. Clin.Vet. **102**:148-153, 1979
- 5) Paltrinieri S, Agnes F, Sartorelli P: Erythrocyte metabolism in healthy dogs and preliminary results in cardiopathic and anaemic dogs. Atti 14° E.S.V.P. Congress, **14**:50, 1996
- 6) Paltrinieri S, Sartorelli P, De Vecchi B, Agnes F: Erythrocyte metabolism in healthy, cardiopathic and anemic dogs. J.Comp.Pathol., **118**:in corso di stampa, 1998.
- 7) Pasquinelli F: Tecniche ematologiche in diagnostica e tecniche di laboratorio. volume 2, sezione 8, ematologia 835; Rosini editrice s.r.l. Firenze, 1984.
- 8) Romanello G: Comportamento della piruvato-chinasi e della glucosio-6-fosfato deidrogenasi nell'eritrocita di cane. Tesi di Laurea in Medicina Veterinaria, Milano, 1980.
- 9) Smith NS, Agar JE: The effect of phlebotomy on canine erythrocyte metabolism. Res. Vet. Sci., **12**, 231-238, 1975.

## SARCOMA RETROPERITONEALE IN UN CANE

Grieco V., Sironi G., Romussi S.\*, Faverzani S.§, Finazzi M.

*Istituto di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviaria;\* Istituto di Clinica Chirurgica Veterinaria; § Istituto di Patologia Speciale e Clinica Medica Veterinaria- Facoltà di Medicina Veterinaria, Milano.*

In questi ultimi tempi ci siamo interessati con i colleghi clinici della patologia prostatica del cane ed in particolare alle neoplasie. Infatti, contrariamente a ciò che avviene nell'uomo le neoplasie prostatiche primarie rappresentano un evento assai raro nella specie canina e parimenti scarse sono le voci bibliografiche presenti in materia (Zucherman e McKeown, 1938; Shlottauer e Millar, 1941; Rickard, 1947; Taylor, 1973; Weaver, 1981; Bell et al., 1991). Ognuna di esse menziona quasi esclusivamente gli adenocarcinomi mentre rarissimi casi di sarcoma sono riportati da Sholl et al. nel 1939. Più recentemente, nella classificazione delle neoplasie animali del WHO Hall et al. nel 1976 ribadiscono che data la scarsità dei casi riportati non è possibile proporre una eventuale classificazione. Ci è sembrato, pertanto, di particolare interesse un caso di sospetta neoplasia prostatica segnalatoci dai clinici.

L'animale considerato nel presente studio era un Boxer maschio di dieci anni che manifestava tenesmo ed una leggera ematuria. All'ecografia dell'apparato urogenitale e dell'ultimo tratto del digerente presentava aree iperecogene sia nella compagine della prostata sia in sede paraprostatica. In seguito ad aggravamento delle condizioni generali il soggetto è stato soppresso e sottoposto ad autopsia presso il nostro Istituto. Macroscopicamente le lesioni più evidenti erano concentrate nel cavo pelvico ove si riscontrava una massa neoplastica coinvolgente ampiamente la prostata, il collo e parzialmente il corpo della vescica, mentre il lume uretrale rimaneva del tutto pervio. La neoplasia era caratterizzata da formazioni nodulari biancastre spesso emorragiche. Analoghe masse di forma nodulare erano disseminate nei tessuti molli circostanti. Il tessuto neoplastico aveva debole consistenza ed al taglio erano visibili centri necrotico-emorragici. Lesioni metastatiche erano riconoscibili nel polmone sotto forma di noduli multipli disseminati del diametro massimo di 2 cm. Entrambi i testicoli risultavano colpiti da neoplasie primarie di aspetto nodulare e di colore giallo-rossastro.

Campioni di tessuto neoplastico sono stati fissati in formalina tamponata al 10% e in methacarnoy ed inclusi in paraffina. Sezioni ottenute dai campioni fissati in formalina sono state sottoposte a colorazione con Ematossilina-Eosina, Alcian PAS e Argento metenamina secondo Grocott. Sulle sezioni ottenute dai campioni fissati in methacarnoy è stata applicata la metodica immunoistochimica avidina-biotina-perossidasi (ABC) utilizzando sieri primari diretti contro: pancitocheratina, citocheratine 13,15 e 16, vimentina,  $\alpha$ -sm actina, desmina e Fattore VIII. Piccoli campioni di tessuto neoplastico fissati in formalina sono stati nuovamente fissati in glutaraldeide al 2%, postfissati in Osmio ed inclusi in resina epossidica per l'esame elettrone-microscopico.

La neoplasia a livello prostatico è costituita da cellule che infiltrano l'interstizio estendendosi fino al rivestimento sieroso che quasi sempre risulta integro. Le strutture ghiandolari, compresse dalla crescita neoplastica, sono modificate nella forma e presentano ristagno di secreto con eventuale flogosi purulenta associata.

Nella vescica la neoplasia si spinge invece dalla sierosa a coinvolgere la muscolatura, arrivando solo in minima parte ad interessare la mucosa. In alcuni casi, le masse neoplastiche presentano un esteso centro necrotico. Nelle sezioni degli organi sopra ricordati numerose strutture vascolari ematiche ed ancor più linfatiche sono invase da cellule neoplastiche strutturate talora in formazioni emboliche.

A più forte ingrandimento le cellule che compongono la neoplasia presentano forma variabile, da decisamente fusata a tondeggianti. I nuclei, da ovoidali a reniformi, hanno aspetto vescicoloso con cromatina dispersa ed uno o più nucleoli ben evidenti; più raramente, per lo più nelle cellule fusate, presentano una maggior quantità di eucromatina. Le mitosi sono assai numerose. Il citoplasma è generalmente abbondante ed i confini cellulari sono facilmente riconoscibili solo nelle aree in cui le cellule appaiono più lassamente distribuite. Solo poche cellule presentano granuli PAS positivi e nei noduli neoplastici il supporto stromale è limitato a pochissime fibrille reticolari.

Nel polmone, accanto a noduli metastatici di maggiori dimensioni riscontrati macroscopicamente, si rinvengono numerosi micronoduli di recente impianto. Di differente natura sono risultate le neoplasie testicolari riferibili, in entrambi i casi, ad adenoma di tipo angiomaso delle cellule interstiziali e sertolioma da differenziato intratubulare ad indifferenziato diffuso.

All'esame immunoistochimico tutte le cellule neoplastiche sono risultate positive solo per vimentina.

All'esame elettronmicroscopico le cellule neoplastiche appaiono lassamente disposte in uno stroma costituito da scarse fibrille collagene. Tali cellule, piuttosto voluminose, hanno per lo più forma irregolarmente poligonale od ovoidale ma tendono talora ad assumere forma più allungata e fusata. I nuclei, ampi, sono irregolarmente ovoidali e presentano introflessioni ed indentature della membrana nucleare. L'eterocromatina è scarsa e raccolta in piccole masserelle prevalentemente addossate alla membrana nucleare. Quando visibile, il nucleolo è di grosse dimensioni e presenta componenti granulare e fibrillari ben distinte. Sono inoltre visibili scarsi granuli peri- ed intercromatinici. Il citoplasma è abbondante e varia maggiormente nel suo aspetto da cellula a cellula. Nella maggior parte delle cellule a forma tondeggianti o poligonale sono presenti numerosi poliribosomi frammentati a filamenti intermedi, ad altrettanto numerosi profili di reticolo endoplasmatico rugoso e ad un discreto numero di mitocondri. In un minor numero, le cellule tumorali presentano anche apparato del Golgi ben sviluppato ed evidente e numerosi lisosomi primari. Quando di forma più allungata e fusata le cellule neoplastiche mostrano invece un citoplasma ancor più ricco di profili di reticolo endoplasmatico rugoso e rare microvescicole disposte lungo la membrana citoplasmatica, mentre quasi del tutto assenti sono le strutture lisosomiali. La membrana citoplasmatica, in tutti i casi, ha contorno piuttosto regolare ed è quasi del tutto priva di digitazioni od introflessioni. Rarissime sono le strutture simil-giunzionali e non si rinvengono in alcun caso lamine o membrane basali in rapporto con le cellule neoplastiche.

Sulla base dei reperti istologici, immunoistochimici ed elettronmicroscopici non è possibile definire con assoluta certezza la cellula di origine della presente neoplasia. Gli esami immunoistochimici, positivi esclusivamente per vimentina, depongono per l'origine mesenchimale ma non consentono un'ulteriore precisazione. Una più approfondita definizione si ricava dai dettagli ultrastrutturali che inquadrano tale cellula neoplastica come elemento mesenchimale indifferenziato a duplice attitudine ed in grado di differenziarsi ora verso elementi con prevalenti aspetti di fibroblasto immaturo (abbondante reticolo endoplasmatico rugoso, vescicole, seppur scarse, lungo la membrana citoplasmatica) ora verso cellule dotate di organuli più caratteristici di istiociti scarsamente differenziati (abbondanti lisosomi, apparato del

Golgi ben sviluppato) (Alguacil-Garcia et al., 1978; Russo et al., 1986; Dickersin, 1988). Nonostante la concomitante presenza di aspetti intermedi tra le due cellule sopra descritte non ci sentiamo di inquadrare la presente neoplasia come istiocitoma fibroso maligno in quanto mancano alcuni dettagli fondamentali quali la presenza di cellule giganti e di un più ricco stroma fibro-reticolare.

Anche l'esatta localizzazione della neoplasia primaria non è definibile con sicurezza visto l'esteso coinvolgimento di prostata e tessuti paraprostatici. Il coinvolgimento prevalente della sierosa e solo parziale e recente della muscolare e della sottomucosa ci induce ad escludere l'origine primaria vescicale. Restano pertanto possibili la prostata ed i tessuti molli paraprostatici quale luogo di insorgenza primaria della neoplasia.

Il comportamento biologico è da ritenersi decisamente aggressivo come si ricava dall'elevatissimo indice mitotico e dalla notevole tendenza all'infiltrazione non solo dei tessuti circostanti ma anche dei vasi ematici e linfatici con conseguente rapida metastatizzazione.

Indipendentemente dall'esatta classificazione e definizione del tumore qui descritto resta comunque il fatto che, come riportato in letteratura, sono estremamente rari i tumori in questa sede ed in particolare i sarcomi.

## **Bibliografia**

- 1) Alguacil-Garcia A., Unni K.K., Goellner J.R.: Malignant Fibrous Histiocytoma. An ultrastructural study of six cases. *Am. J. Clin. Pathol.* **69**: 121-129, 1978.
- 2) Bell F.W., Klausner J.S., Hayden D.W., Feeney D.A., Johnston S.D.: Clinical and pathologic features of prostatic adenocarcinoma in sexually intact and castrated dogs: 31 cases (1970-1987). *JAVMA*, **199**: 1623-1630, 1991.
- 3) Dickersin G.R.: *Diagnostic Electron Microscopy: a text /atlas*. Igaku-Shoin, New York, pp. 157-260, 1988
- 4) Hall S.W., Nielsen S.W., McEntee K.: Tumors of the prostate and penis. *Bulletin of the World Health Organization*, **53**: 137-304, 1976.
- 5) Rickard C.G.: The pathology of the prostate gland of man and the dog: a review. *The Cornell Vet.*, **37**: 241-253, 1947.
- 6) Russo J., Tait L., Russo I.H.: Guidelines in the Ultrastructural Diagnosis of Tumors. In *Tumor Diagnosis by Electron Microscopy*. Ed. by Russo J. and Sommers S.C., Field, Rich and Associates, Inc., New York, pp. 15-126, 1986
- 7) Shlottauer C.F., Millar J.A.S., 1941, cit. da Rickard, 1947.

- 8) Taylor P.A.: Prostatic adenocarcinoma in a dog and a summary of ten cases. *Can Vet. J.*, **14**: 162-166, 1973.
- 9) Weaver A.D.: Fifteen cases of prostatic carcinoma in the dog. *Vet. Rec.*, **25**: 71-75, 1981.
- 10) Zucherman S., McKeown T., 1938 cit. da Rickard, 1947.

## **MALATTIA POLICISTICA EPATICA NEL CRICETO DORATO (*Mesocricetus auratus*)**

F. Mutinelli, Maria Augusta Bozza, F. Agnoletti  
*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie*

### **Introduzione**

La malattia epatica policistica è descritta nell'uomo (Cotran *et al.*, 1994), nel cane (MacKenna e Carpenter, 1980; Van den Ingh e Rothuizen, 1985), nel cervo dalla coda bianca (Picone *et al.*, 1981) e in alcuni animali da reddito (Jubb *et al.*, 1993).

E' stata inoltre segnalata nel criceto dorato (*Mesocricetus auratus*) sia associata a lesioni cistiche a carico di diversi organi (Gleiser *et al.*, 1970) che con il solo interessamento del fegato (Somvanshi *et al.*, 1987).

La presente nota riguarda tre casi spontanei di malattia epatica policistica nel criceto dorato.

### **Materiali e metodi**

Presso le strutture della "European Application Group" (Nestlé Italiana S.p.A.) di Bertolo (UD) vengono allevate diverse specie animali "da compagnia" (uccelli, roditori, lagomorfi, pesci, anfibi) al fine di valutare la perfetta rispondenza degli alimenti somministrati (Friskies® Italia) alle esigenze fisiologiche delle stesse.

Nel corso dell'esame necroscopico di animali deceduti spontaneamente nel gennaio-febbraio 1998, si sono riscontrati tre criceti dorati, due maschi ed una femmina di età superiore ai 24 mesi, il cui fegato era interessato dalla presenza di cisti multipla. Nessuno degli altri organi presentava alterazioni macroscopicamente rilevabili.

Il fegato dei tre soggetti, oltre a rene, milza e polmone, sono stati fissati in formalina tamponata 10% e successivamente inclusi in paraffina. Da questi sono state allestite sezioni istologiche dello spessore di 4 m colorate con ematossilina-eosina e con il metodo tricromico di Masson.

Il liquido contenuto nelle cisti epatiche di maggiori dimensioni è stato centrifugato (Cytospin 3, Shandon®) e gli strisci ottenuti sono stati colorati con Diff-Quik® e metodo di Gram.

## **Risultati**

Nessuno degli animali aveva manifestato sintomi clinici prima di essere trovato morto nel corso del controllo giornaliero.

All'apertura della cavità addominale nei lobi epatici si è rilevata la presenza di formazioni cistiche multiple del diametro variabile da 0,2 a 2,5 cm. proclivi sulla superficie epatica. Le cisti di dimensioni maggiori si sostituivano ad ampie porzioni del parenchima fino ad interessare un intero lobo epatico.

La parete delle cisti era sottile e lasciava intravedere un liquido incolore variabile in quantità in funzione delle dimensioni delle cisti stesse.

Il fegato era di colore marrone pallido, consistenza normale e decisamente atrofico in alcune aree. L'estensione delle lesioni cistiche interessava fino al 70% del parenchima epatico.

Non si sono rilevate alterazioni macroscopiche a carico degli altri organi.

L'esame microscopico del liquido cistico non ha evidenziato la presenza di elementi parassitari o di loro frammenti, così come quello del citocentrifugato non ha permesso di evidenziare elementi batterici, ma solo eritrociti e detriti cellulari.

Istologicamente erano presenti cisti uniloculari di piccole dimensioni e multiloculari, solitamente di dimensioni maggiori. La parete di dette cisti era sottile e rivestita da epitelio piatto o cubico, mentre il lume occupato da modesta quantità di liquido eosinofilo, eritrociti e detriti cellulari.

Il parenchima epatico circostante le cisti presentava modificazioni di gravità variabile che andavano dalla semplice compressione e congestione dei vasi all'atrofia da compressione e necrosi, alla proliferazione fibroconnettivale in cui residuavano solo rare isole di epatociti.

In alcuni campi erano evidenti la proliferazione dei dotti biliari e focolai di infiltrazione linfocitaria.

Non si sono rilevate alterazioni istologiche a carico degli altri organi esaminati.

## Discussione

Come riportato da Jubb *et al.* (1993) le lesioni cistiche a carico del fegato possono essere acquisite o congenite. Nel primo caso si considerano le cisti parassitarie che possono tuttavia venire escluse nel nostro caso in quanto sia l'esame istologico delle cisti che del liquido in esse contenuto non hanno evidenziato, neppure dopo citocentrifugazione, la presenza di elementi parassitari o loro parti. Altra possibilità è rappresentata da cistoadenoma biliare che si avvicina molto alle lesioni osservate, ma che tuttavia non erano accompagnate dalle alterazioni croniche solitamente associate.

Anche un'eventuale azione di sostanze tossiche derivanti dalla dieta può essere esclusa, in quanto essa viene sottoposta a controlli per le micotossine e sterilizzata all'origine.

La natura congenita di queste lesioni, come conseguenza della mancata fusione delle porzioni inter ed intralobulari dei dotti o della mancata scomparsa dei dotti biliari soprannumerari, sembra quindi l'ipotesi più probabile.

Ad analoghe conclusioni sono giunti anche altri Autori (Gleiser *et al.*, 1970; Somvanshi *et al.*, 1987) che hanno descritto queste lesioni nel criceto dorato in 17 e 7 casi rispettivamente. Nel caso del primo Autore le cisti erano presenti anche in altri organi, mentre in entrambi si trattava di colonie inbred. Questo aspetto va ovviamente ad ulteriore sostegno dell'origine congenita delle cisti. Sfortunatamente nei tre casi da noi osservati non si disponeva di alcuna informazione sull'origine degli animali, fatto salvo per la data di introduzione degli animali nell'allevamento, maggio 1995 per un criceto e aprile 1996 per gli altri due. I decessi, avvenuti il 28 gennaio, 5 e 14 febbraio 1998, attribuiscono a questi animali un'età superiore a 33 e 22 mesi rispettivamente.

Il riscontro di lesioni cistiche nel fegato di criceti appartenenti a queste classi di età concorda con le osservazioni di Gleiser *et al.* (1970) che hanno registrato dette lesioni nel 57,5 (23/40) e 75,8% (22/29) di soggetti di 1-27 e 13-27 mesi rispettivamente. Secondo questi Autori l'incidenza delle lesioni sembra essere età-dipendente, ma non legata al sesso.

Va inoltre ricordato che i caratteri macroscopici ed istologici delle cisti epatiche descritte nel criceto, sia in letteratura che nel nostro caso, sono del tutto simili alle cisti congenite segnalate nel cane (MacKenna e Carpenter, 1980; Van den Ingh e

Rothuizen, 1985), nel cervo dalla coda bianca (Picone *et al.*, 1981) e negli animali da reddito (Jubb *et al.*, 1993).

La malattia policistica epatica del criceto mostra inoltre maggiori somiglianze con la malattia cistica congenita dell'uomo (Cotran *et al.*, 1994) che non con la fibrosi cistica in cui, alle caratteristiche lesioni epatiche, si associano anche quelle polmonari e pancreatiche.

In conclusione si sottolinea la singolarità del reperto e l'importanza che riveste un'attenta valutazione, anche in sede necroscopica, degli animali allevati per lunghi periodi ai fini del rilevamento delle patologie età-dipendenti.

### **Riassunto**

Vengono descritti tre casi di malattia policistica epatica nel criceto dorato (*Mesocricetus auratus*). Questi animali, due maschi ed una femmina di età superiore ai 22 mesi deceduti spontaneamente e senza sintomi clinici, presentavano numerose cisti a sede epatica (0,2-2,5 cm). Le cisti di dimensioni maggiori facevano procidenza sulla superficie epatica e contenevano quantità variabili di liquido sieroso trasparente, interessando fino al 70% del parenchima epatico. Istologicamente le cisti erano uni o multiloculari e delimitate da epitelio cubico o piatto. Il parenchima circostante era interessato da congestione e lieve compressione, atrofia da compressione e necrosi fino a grave sclerosi con completa scomparsa degli epatociti. Si sono inoltre riscontrati proliferazione dei dotti biliari e focolai di infiltrazione linfocitaria.

### **Summary - Polycystic liver disease in golden hamsters (*Mesocricetus auratus*)**

Spontaneous polycystic liver disease in three asymptomatic golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) is described. *Post mortem* examination showed multiple, thin-walled cysts of different sizes (0.2-2.5 cm) and shape in the liver. The larger cysts protruded from the liver surface and contained a colourless, serous fluid and affected up to 70% of the hepatic parenchima. Histologically, the cysts were uni-or multilocular and lined by cuboidal to flattened epithelium.

The liver parenchima around cysts showed sinusoids and other blood vessels congestion, pressure atrophy, necrosis, mild fibrosis and seldom bile ducts proliferation and focal lymphocytic infiltration.

### **Bibliografia**

- 1) Gleiser CA, Van Hooster GL, Sheldon WG: A polycystic disease of hamsters in a closed colony. *Laboratory Animal Care* 20, 923-929, 1970
- 2) Somvanshi R, Iyer PKR, Biswas JC, Koul GL: Polycystic liver disease in golden hamsters. *J Comp Path* 97, 615-618, 1987
- 3) Percy DH, Barthold SW: *Pathology of Laboratory Rodents and Rabbits*. p. 134. Iowa State University Press, Ames, Iowa, 1993
- 4) Jubb KVF, Kennedy C, Palmer N: *Pathology of Domestic Animals*. 4th ed., p. 322. Academic Press, London, 1993
- 5) Picone J, Williams JF, Wesley Leid R, Fay LD: Polycystic liver in four white-tailed deer. *J Wild Dis* 17, 395-400, 1981
- 6) Van den Ingh TSGAM, Rothuizen J: Congenital cystic disease of the liver in seven dogs. *J Comp Path* 95, 405-514, 1985
- 7) MacKenna SC, Carpenter JL: Polycystic disease of the kidney and liver in the Cairn terrier. *Vet Path* 17, 436-442, 1980
- 8) Cotran RS, Cumar V, Robbins SL: *Robbins-Pathologic Basis of Disease*. 5th ed., p. 831. Saunders, Philadelphia, 1994

## CARCINOMA EPATOCELLULARE ASSOCIATO AD INFESTAZIONE DA CAPILLARIA NELLA TROTA IRIDEA (*Oncorhynchus mykiss*).

Beraldo Paola<sup>1)</sup>, Sarti Massimo<sup>3)</sup>, Volpatti Donatella<sup>1)</sup>, Frangipane di Regalbano Antonio<sup>2)</sup>, Galeotti Marco<sup>1)</sup>.

<sup>1)</sup>Unità di Patologia Comparata, <sup>2)</sup>Unità di Parassitologia, Dipartimento di Scienze della Produzione Animale, Università di Udine, Via delle Scienze 206, 33100, Udine.

<sup>3)</sup>Hendrix, Italia, Via Mozzecane, Verona.

### Introduzione

La capillariosi epatica nei pesci d'acqua dolce è stata descritta in Europa ed in Asia da differenti autori (Moravec, 1994; Ghittino, 1961, 1985; Masoero e Forneris, 1986). La prima segnalazione di tale parassitosi si deve a Schulman (1948) come *Hepaticola petruschewskii*; in seguito nel 1961 Ghittino ha riportato una più completa descrizione denominandola *Capillaria eupomotis*. La biologia di tale nematode è stata descritta da Thieme (1961) e poi da Kutzer e Otte (1966) i quali hanno suggerito di identificarlo come *Capillaria petruschewskii*. Attualmente Moravec (1994) lo ha classificato come genere *Schulmanella* (Ivashkin, 1964 citato da Moravec, 1994) di cui l'unica specie é *S. petruschewskii*, riportando quali sinonimi le nomenclature sopra citate.

*S. petruschewskii* è un nematode di medie dimensioni (6-15 mm) che esibisce un basso grado di specificità per l'ospite, essendo stato ritrovato in molte specie di differenti famiglie. Questo parassita ha come sede elettiva il fegato ed il suo rinvenimento è più frequente nei pesci selvatici e negli ambienti dove sono presenti l'ospite intermedio (un anellide) e la fauna ittiofaga. Esistono, tuttavia, segnalazioni di capillariosi in pesci di allevamento, anche se, vista la bassa patogenicità del parassita, i dati sulla sua diffusione sono sicuramente sottostimati. Il carcinoma epatocellulare è una neoplasia spontanea descritta frequentemente nella trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) di allevamento (Roberts, 1989; Ghittino, 1985), nei Salmonidi ed anche in altre specie di pesci (Takashima, 1976; Smith *et al.*, 1979). Nell'eziopatogenesi di questa neoplasia si fa spesso riferimento all'azione cancerogena esercitata dalle aflatossine che possono inquinare i mangimi (Roberts, 1978; Schoenhard *et al.*, 1981 citato da Post, 1987; Ghittino, 1985) oppure alla presenza di idrocarburi aromatici nelle acque (Smith *et al.*, 1979). In questa indagine viene segnalato un episodio di capillariosi epatica in trote iridee provenienti da una tipica realtà di allevamento in policoltura in Friuli-Venezia Giulia. Tra

i soggetti colpiti da capillariosi sono stati rinvenuti due casi di carcinoma epatocellulare. Vengono descritti i quadri istologici peculiari della neoplasia e quelli indotti dal parassita nel fegato.

## **Materiali e metodi**

Le trote iridee provenivano da un'azienda agricola che pratica policoltura nella pianura friulana. Nel periodo primaverile-estivo, in tale azienda è stata registrata una moderata mortalità tra i soggetti di media e grossa taglia, imputabile, dopo accertamenti anatomico-patologici e batteriologici, a bocca rossa. In alcuni soggetti, che si presentavano particolarmente emaciati, è stata riscontrata una infestazione da nematodi localizzata a livello epatico.

Sono stati utilizzati 9 soggetti, di taglia variabile tra 0,5 e 1,3 kg, dai quali sono stati prelevati organi interni da destinare alle successive indagini parassitologiche ed istologiche. Campioni di fegato, milza e contenuto intestinale sono stati esaminati a fresco con stereomicroscopio e microscopio ottico per individuare il parassita.

Per la processazione istologica sono state utilizzate porzioni di fegato, milza, rene, cuore, stomaco, intestino fissate in formalina tamponata al 10%. Le sezioni, colorate con Ematossilina-Eosina, Gomori e Tricromica di Masson, sono state osservate al microscopio ottico (Leitz DMRB).

## **Risultati**

Dei 9 soggetti campionati, 7 sono risultati infestati. L'osservazione allo stereomicroscopio di sezioni grossolane del tessuto epatico ha permesso di osservare parassiti capillariformi di colore bianco-latteo. L'esame microscopico a fresco di piccole porzioni di parenchima epatico ha messo in evidenza uova di aspetto limoniforme provviste di tappi polari, larve a diverso stadio di sviluppo e parassiti adulti. Non sono mai stati osservati uova e/o parassiti nella milza e nel contenuto intestinale. Il fegato dei soggetti parassitati appariva scuro, aumentato di volume, con il profilo dei margini arrotondato e con evidente ispessimento della glissoniana, dalla quale trasparivano spesso piccoli noduli biancastri. La consistenza e la resistenza al taglio risultavano aumentate. In sezione, il parenchima epatico si presentava di colore scuro (verde-nerastro) disseminato da numerosi noduli biancastri. Le dimensioni dei noduli erano in genere limitate a pochi millimetri, ma in due dei soggetti esaminati si osservavano delle neoformazioni globose

nodulari bianco giallastre di notevoli dimensioni (circa 2 cm). In alcuni soggetti la milza appariva notevolmente aumentata di volume e, in taluni casi, presentava piccoli noduli biancastri simili a quelli rilevati nel fegato. Gli altri organi del pacchetto viscerale apparivano privi di alterazioni patologiche.

All'esame istologico l'organo maggiormente coinvolto era il fegato. Nei soggetti infestati le lesioni erano riconducibili a tre principali quadri riferibili a diversi stadi della malattia. Il I° quadro riguardava 2 soggetti, nei quali il parenchima epatico si presentava disseminato di uova isolate o riunite in piccoli ammassi. Sovente si osservavano parassiti adulti in fase di migrazione. Le uova rinvenute nel parenchima erano circondate da una blanda reazione fibro-connettivale messa in rilievo dalla tricromica di Masson e non evidenziata attorno ai parassiti. La reazione flogistica cellulare era caratterizzata da poche cellule mononucleate, per lo più linfociti, localizzate più frequentemente in vicinanza delle uova. Gli epatociti si presentavano nella norma e l'architettura del tessuto epatico era discretamente conservata. Nel II° quadro (3 soggetti) la reazione fibro-connettivale appariva più imponente. Il tessuto epatico presentava rari parassiti in fase migratoria e numerosissime uova disposte singolarmente o in piccoli ammassi circondati da spesse capsule fibro-connettivali. Si notava inoltre un'intensa reazione cellulare (linfociti e melanomacrofagi) soprattutto in prossimità dei dotti biliari, delle uova e di alcuni parassiti. Talvolta la reazione fibro-connettivale coinvolgeva anche gruppi di epatociti che presentavano evidenti segni di sofferenza, caratterizzati da iperacidofilia del citoplasma e dalla presenza di nuclei picnotici. Non era infrequente il rinvenimento di grosse cellule multinucleate soprattutto in prossimità delle aree parassitate. Le cellule multinucleate avevano le stesse caratteristiche tintoriali delle cellule epatiche, evidenziando tuttavia una maggiore acidofilia dei citoplasmi. Non si osservavano cellule epitelioidi nelle reazioni flogistiche più avanzate attorno ai parassiti. Nei due soggetti che macroscopicamente presentavano le neoformazioni nodulari è stato descritto il III° quadro, che riuniva alterazioni patologiche del tutto nuove rispetto alle precedenti. In ampie zone del tessuto epatico di entrambe le trote le lesioni istologiche erano del tutto sovrapponibili a quelle delineate nel II° quadro. Anche in tal caso non mancavano aspetti degenerativi degli epatociti e si osservavano cellule multinucleate. L'aspetto peculiare osservato in questi soggetti era la presenza di ampie porzioni di tessuto epatico neoformato delimitate da una capsula ben evidente con la tricromica di Masson. Le neoplasie erano costituite da abbondante tessuto fibro-connettivale, organizzato in fasci di fibre collagene, delimitanti

piccole formazioni adenomatose rotondeggianti composte da epatociti neoplastici. Tali epatociti, disposti a formare cordoni irregolari, risultavano di dimensioni leggermente aumentate e moderatamente atipici, con grossi nuclei chiari ed evidenti nucleoli. In altri casi i noduli perdevano completamente la strutturazione in cordoni e gli epatociti neoplastici erano tra loro distaccati, con atipie nucleari e rare mitosi. Spesso questi noduli erano aggrediti da un'abbondante infiltrazione di monociti-macrofagi dall'aspetto schiumoso. All'interno della capsula delimitante la massa di tessuto neoformato, le uova di capillaria erano rare. Le alterazioni neoplastiche a carico del fegato descritte in queste due trote erano ascrivibili ad un carcinoma epatocellulare. In uno dei due soggetti, tra le fibre muscolari del miocardio, si è evidenziato un gruppetto di cellule simile per dimensioni e caratteristiche istochimiche (PAS positività) alle cellule epatiche neoformate. Tali cellule costituivano una metastasi cardiaca del carcinoma epatocellulare. Sempre a livello cardiaco, nello stesso pesce, sono state riscontrate rare uova di capillaria fra le fibre miocardiche, non circondate da fibre connettivali e da infiltrato infiammatorio. Non sono state osservate alterazioni istologiche degne di rilievo a carico degli altri organi valutati.

## **Discussione**

Il reperto di capillariosi epatica nei soggetti di trota iridea esaminati, potrebbe essere ascritto a nematodi appartenenti al genere *Schulmanella*. Sulla base della letteratura esistente al riguardo, nella famiglia Capillaridae l'unica specie del genere *Schulmanella* ad avere quale organo bersaglio il fegato è *S. petruschewski*. Inoltre, nell'ambiente e nella tipologia dell'allevamento da cui i soggetti provenivano, sembrano sussistere tutti gli elementi caratteristici del ciclo biologico di tale parassita, quali la fauna ittiofaga e l'ospite intermedio (*Eiseniella tetraedra*) (Moravec, 1994). Al momento attuale non è stata ancora effettuata una precisa identificazione del nematode in questione. In tutti i soggetti esaminati, l'organo maggiormente coinvolto era il fegato. Il quadro che si evince è quello di una epatite cronica di tipo fibrotico indotta dalla capillariosi. Le lesioni epatiche osservate nei vari soggetti sono riconducibili a due tipologie principali, che riflettono differenti stadi evolutivi della parassitosi. Nel primo stadio l'infestazione epatica era massiva, caratterizzata da numerose uova sparse o riunite in gruppetti e da adulti in fase di migrazione. La reazione flogistica era ancora iniziale e l'architettura dell'organo ben conservata. Nel secondo stadio si osservava una intensificazione sia della reazione fibro-

connettivale che della reazione flogistica cellulare, con peculiari caratteristiche di cronicità. Di notevole interesse è il III quadro descritto, in quanto capillariosi epatica e carcinoma epatocellulare potrebbero essere fenomeni concomitanti e sovrapposti oppure consequenziali. Vista l'alta incidenza del carcinoma epatocellulare della trota (Ghittino, 1985), provocato sovente dall'ingestione di alimenti inquinati da aflatossine, la prima ipotesi sembra avere maggiore credibilità; alcune trote dell'allevamento potrebbero avere sviluppato una neoplasia epatica ed essersi allo stesso tempo infestate con capillaria, manifestando così sovrapposizione dei due fenomeni ed esasperazione del processo fibroconnettivale riparativo. L'ipotesi che le lesioni neoplastiche siano state provocate dalla parassitosi è difficilmente dimostrabile. Essa non è comunque da escludere a priori, in quanto è noto che le neoplasie possono essere indotte da stimoli irritativi continui e prolungati nel tempo. Un'infestazione da capillaria epatica potrebbe essere uno stimolo (meccanico e chimico) sufficiente a determinare tale lesione. Bisogna infatti ricordare che esistono altri esempi di parassiti in grado di indurre trasformazioni neoplastiche, come *Spirocerca lupi*, che provoca neoplasie a carico dell'esofago del cane e *Cysticercus fasciolaris*, responsabile dei sarcomi nel fegato di ratto (Marcato, 1997). Interessante è anche il rinvenimento di uova del parassita a livello cardiaco, concomitante alla presenza di metastasi carcinomatose nello stesso organo. Dai dati bibliografici disponibili non risulta segnalato il reperimento di uova di capillaria nel tessuto miocardico di pesci. Questa indagine, sebbene limitata alla descrizione istologica delle lesioni, rappresenta comunque un interessante punto di partenza per ulteriori approfondimenti sulla possibile associazione parassita-tumore nell'eziopatogenesi di alcuni processi neoplastici.

## **Bibliografia**

- 1) Ghittino P: Su una capillariosi epatica in trote di allevamento e in altri Teleostei delle acque libere del bacino del Po in Piemonte, con descrizione di una nuova specie (*Capillaria eupomotis*). Riv. Parassit., **22**, 193-204, 1961.
- 2) Ghittino P: Tecnologia e patologia in acquacoltura. Edizioni Bono, Torino. Vol. 2, Patologia, pp 352-358, 1985.
- 3) Kutzer E, Otte E: *Capillaria petruschewskii* (Shulman, 1948): Morphologie, Biologie und Pathogene Bedeutung. Z. Parasitenk., **28**: 16-30, 1966.
- 4) Marcato PS: Anatomia e istologia patologica generale veterinaria. Ed. Esculapio, Bologna, pp 496-497, 1997.

- 5) Masoero L, Forneris G: Prime osservazioni sulla capillariosi epatica rinvenuta nella trota marmorata (*S. Trutta marmoratus*) del Po in Piemonte. Riv. It. Piscic. Ittiop. **XXI** (3), 97-99, 1986.
- 6) Moravec F: Parasitic nematodes of freshwater fishes of Europe. Eds. Kluwer Academic Publisher, London, 1994.
- 7) Post G: Neoplastic diseases in fish. In "Textbook of Fish Health", T.F.H. Publ., Inc. Pp 241-249, 1987.
- 8) Roberts RJ: Neoplasia of Teleosts, pp 153-172. In "Fish Pathology", RJ Roberts (Ed), Baillière Tindall, London, 1989.
- 9) Smith CE, Peck TH, Klauda RJ, McLarens JB: Hepatomas in Atlantic tomcod *Microgadus tomcod* (Walbaum) collected in the Hudson river estuary, New York. J. Fish Dis., **2**, 313-319, 1979.
- 10) Takashima F: Hepatoma and cutaneous fibrosarcoma in hatchery-reared trout and salmon reared to gonadal maturation. Prog. Exp. Tumours Res., **20**, 351-366, 1976.
- 11) Thieme H: *Capillaria acerinae* nov. Spec. (Nematoda, Trichuroidea), ein neuer Haarwurm aus der Leber von Kaulbarsch (*Acerina cernua*). Zool. Anz., **166**, 136-139, 1961.