



ASSOCIAZIONE ITALIANA
DI PATOLOGIA VETERINARIA

AIPVet

ASSOCIAZIONE ITALIANA DI PATOLOGIA VETERINARIA

ATTI VI CONGRESSO NAZIONALE

ISSN 1825 - 2265



NAPOLI

15-16 Maggio 2009



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI
FEDERICO II

Premio Ennio Sanna 2009

DISTRIBUZIONE DELLA PROTEINA PRIONICA PATOLOGICA (PrP^{Sc}) IN ORGANI DI OVINI
AFFETTI DA SCRAPIE E DA CONCOMITANTI PATOLOGIE INFIAMMATORIE CRONICHE

*Cancedda Giovanna Maria, Marruchella Giuseppe, Di Guardo Giovanni, Demontis Francesca, Maestrone
Caterina, Santucci Cinzia, Macciocu Simona, Saba Mariangela, Denti Stefano, Ligios Ciriaco*

Premio Rosario Preziosi 2009

SCRAPIE NATURALE E SPERIMENTALMENTE INDOTTA PER OS IN OVINI DI RAZZA SARDA:
RECENTI ACQUISIZIONI IN AMBITO PATOGENETICO

*Marruchella Giuseppe, Ligios Ciriaco, Cancedda Maria Giovanna, Demontis Franca, Chiocchetti Roberto,
Clavenzani Paolo, Lalatta-Costerbosa Giovanna, Gioia Luisa, Di Guardo Giovanni*

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

Relazioni ad invito

Cancer in fish: a health indicator in wild populations
Feist Stephen W.

Comunicazioni

LE PATOLOGIE CUTANEE IN CETACEI SPIAGGIATI LUNGO LE COSTE PUGLIESI
Passantino G., Tinelli A., Cascone V., Lo Presti G., Zizzo N.

STUDIO ISTOPATOLOGICO DI *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* NELLE ACQUE CAMPANE
Carella F., De Vico G.

ISTIOCITOSI PROGRESSIVA FELINA: ASPETTI MORFOLOGICI ED IMMUNOCITOCHIMICI DI UN CASO
Sforna M., Brachelente C., Lepri El., Capuccini S., Pinto da Cunha N., Mechelli L.

COLLAGENOSI PERFORANTE IN UN GATTO
Brachelente C., Sforna M., Lepri E., Capuccini S.

MORTE IMPROVVISA NEL CAVALLO: UN LABIRINTO DIAGNOSTICO
Lepri E., Passamonti F., Sforna M., Brachelente C., Leonardi L., Vitellozzi G.

STUDIO ISTOPATOLOGICO SUL MUSCOLO DI CANI ANZIANI
Costagliola A., Pagano T.B., Trapani F., Martano M., Papparella S., Paciello O.

MIOPATIE INFIAMMATORIE IN BOVINI ANZIANI: UN MODELLO PER L'INCLUSION BODY MYOSITIS?
Trapani F., Costagliola A., Iovane V., Roperto F., Papparella S., Paciello O.

RILIEVI ANATOMO-ISTOPATOLOGICI IN TOPI P27 KNOCK-IN T197A
Iovane V., De Marco C., Forzati F., Scarfò M., Fusco A., Trapani F., Paciello O., Biglietto G., Papparella S.

MODULAZIONE IN VITRO DELLA FAGOCITOSI E DELLA PRODUZIONE DI SPECIE REATTIVE DELL'OSSIGENO (ROS) DI NEUTROFILI CAPRINI IN PRESENZA DI ACIDI GRASSI Ω -3 POLINSATURI (EPA E DHA)
Pisani L.F., Lecchi C., Invernizzi G., Agazzi A., Sartorelli P., Savoini G., Cecilian F.

UN CASO DI NEFROTOSSICOSI ASSOCIATA AD INTOSSICAZIONE ALIMENTARE DA MELAMINA
Vascellari M., Cocchi M., Gallina A., Agnoletti F., Angeletti R., Mutinelli F.

RUOLO DI HER-2 NELLA PROGnosi DEI TUMORI MAMMARI DELLA CAGNA
Puleio R., Ressel L., Loria G.R., Schiavo M.R., Millanta F., Caracappa S., Poli A.

LA DIFFERENZIAZIONE CELLULARE NEL TUMORE MAMMARIO DEL CANE: STUDIO IMMUNOISTOCHEMICO SU 18 TUMORI MALIGNI PLEOMORFI
Rasotto R., Zappulli V., Castagnaro M.

MODELLO FELINO PER LO STUDIO DELLE LESIONI MAMMARIE PRE-INVASIVE ER/PR NEGATIVE DELLA DONNA

Burrai G.P., Miller M.A., Marras V., Pirino S., Cabras F.L., Anfossi A.G., Leoni A., Addis M.F., Mohammed S.I., Antuofermo E.

ATTIVAZIONE E CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DELL'ONCOGENE AKT NEI TUMORI MAMMARI FELINI

Maniscalco L., De Maria R., Iussich S., Minelli C., Olivero M., Sasaki N., Biolatti B.

INDICATORI ISTOPATOLOGICI DI PROGNOSI NEL MASTOCITOMA CUTANEO E VISCERALE DEL GATTO

Sabattini S., Bettini G.

OVER-ESPRESSIONE DELLA CATENA PESANTE DELLA FERRITINA NEI TUMORI DELLA VESCICA NEL BOVINO

Brun R., Russo V., Urraro C., Roperto S., Paciello O., Borzacchiello G., Roperto F.

APPLICAZIONE DELLA TECNICA ISTOLOGICA 3D NELLA VALUTAZIONE DEI MARGINI CHIRURGICI IMPIEGANDO IL SARCOMA INIEZIONE-INDOTTO FELINO (FIIS) COME MODELLO

Grieco V., Giudice C., Fulvia R., Stefanello D., Romussi S., Cantatore M., Di Giancamillo M.

ANALISI DEL PATTERN DI ESPRESSIONE DI MICRORNA IN NEOPLASIE LINFOPROLIFERATIVE CANINE

Gelain M.E., Gioia G., Mortarino M., Comazzi S.

DIAGNOSI ULTRASTRUTTURALE DI MIOPERICITOMA CUTANEO NEL CANE

Palmieri C., Cimini M., Avallone G., Roccabianca P., Damiano . Della Salda L.

ESPRESSIONE IMMUNOISTOCHEMICA DI VEGF, Flk1 E CTGF NEI TUMORI PERIVASCOLARI DEL CANE

Avallone G., Rebughini A., Stefanello D. Roccabianca P.

STUDIO ISTOLOGICO ED IMMUNOISTOCHEMICO DEL SERTOLIOMA DEL CANE

Banco B., Gerosa E., Giudice C., Grieco V.

MALATTIA DELLE MUCOSE: ALTERAZIONI IMMUNOFENOTIPICHE IN BOVINE CON PATOLOGIA SPONTANEA

Binanti D., Rondena M., Lorenzi V., Pravettoni D., Gelmetti D., Finazzi M., Riccaboni P.

STUDI PRELIMINARI DELL'ESPRESSIONE DI OvPV-3 NEL CARCINOMA SQUAMOCELLULARE OVINO MEDIANTE TECNICHE DI INDAGINE IN SITU

Anfossi A.G., Cubeddu T., Antuofermo E., Alberti A., Pintore F., Cabras F.L., Burrai G.P., Foddai G., Pirino S.

DISTRIBUZIONE DELLA PROTEINA PRIONICA PATOLOGICA (PrP^{Sc}) IN ORGANI DI OVINI AFFETTI DA SCRAPIE E DA CONCOMITANTI PATOLOGIE INFIAMMATORIE CRONICHE

Cancedda G.M., Marruchella G., Di Guardo G., Demontis F., Maestrone C., Santucci C., Macciocu S., Saba M., Denti S., Ligios C.

STUDIO SULLA PRESENZA DI *MYCOBACTERIUM CAPRAE* IN ALLEVAMENTI BOVINI E BUFALINI DELLA REGIONE CAMPANIA

Ascione G., Iovane V., Cozza D., Scognamiglio F., Iuliano S., Galiero G., Paciello O.

PATHWAYS MOLECOLARI ALLA BASE DELLA CANCEROGENESI UROTELIALE INDOTTA DAL PAPPILLOMAVIRUS BOVINO

Corteggio A., Urraro C., Roperto F., Borzacchiello G.

ESPRESSIONE DI MHC CLASSE I E II E CARATTERIZZAZIONE DELL'INFILTRATO INFIAMMATORIO NEI CARCINOMI DELLA VESCICA DEL BOVINO ASSOCIATI A BPV-2

Russo V., Roperto S., Paciello O., Roperto F.

RISPOSTE CELLULARI DI LEUCOCITI FELINI INCUBATI CON PEPTIDI IMMUNOGENI DI CORONAVIRUS FELINO (FCoV)

Rossi G., Corsaro C., Battilani M., Paltrinieri S.

CONFRONTO TRA TEST DIAGNOSTICI IN CASI ATIPICI DI “SOSPETTA PERITONITE INFETTIVA FELINA”

Giori L., Giordano A., Giudice C., Grieco V., Paltrinieri S.

LE PROTEINE DI FASE ACUTE DELLO STAMBECCO (*CAPRA IBEX*) DURANTE INFESTAZIONE DA ROGNA SARCOPTICA (*Sarcoptes scabiei*)

Md Rahman M., Fraquelli C., Sartorelli P., Lecchi C., Ceciliani F.

RACTOPAMINA IDROCLORURO NEL SUINO IN FINISSAGGIO: CROSS-TALKING TRA SISTEMA ADRENERGICO, STEROIDEO E TIROIDEO

Catalano D., Raimondi S., Queliti R., Amedeo S., Bellino C., Biasibetti E.a, D'Angelo A., Perona G., Pollicino P., Savarino P., Tomassone L., Zanatta R., Odore R., Capucchio M.T.

IMMUNITÀ CELLULO-MEDIATA IN CORSO DI VACCINAZIONE E INFEZIONE VIRALE NEL SUINO: TECNICHE E CRITERI DI VALUTAZIONE

Ferrari L., De Angelis E., Corradi A., Martelli P., Borghetti P.

RISPOSTA CELLULO-MEDIATA, QUADRI ISTOPATOLOGICI E RUOLO PROTETTIVO DELLA VITAMINA E IN SUINI SPERIMENTALMENTE INTOSSICATI CON OCRATOSSINA A (OTA)

Jottini S., Cantoni A.M., De Angelis E., Ferrari L., Di Lecce R., Passeri B., Borghetti P., Corradi A.

Poster

INDAGINE ANATOMO-ISTOPATOLOGICA SULL'ARTERIOSCLEROSI DEL CAVALLO

Anfossi A.G., Boeddu L., Antuofermo E., Cabras F.L., Burrai G.P., Nieddu A.M., Pirino S.

LEUCOENCEFALOMIELITE DA VIRUS MAEDI -VISNA IN OVINI DI RAZZA SARDA

Cancedda G.M., Puggioni G., De Giudici S., Demontis F., Ennio B., Maestrone C., Patta C., Macciocu S., Denti S., Pira A., Carzedda D., Ligios C.

CORRELAZIONI CLINICO-PATOLOGICHE NELLE NEUROPATIE ASSONALI PERIFERICHE DEL CANE

Salvadori C., Sonaglio L., Falzone C., Cantile C.

RINOSINUSITE MICOTICA IN UN GATTO: ISOLAMENTO DI *FUSARIUM* SPP.

Carminato A., Danesi P., Vascellari M., Carniel Ma., Granato A., Mutinelli F.

EFFETTI DELL'ESPOSIZIONE AL CADMIO NEL CERVELLO DI *Danio rerio*

Coppola M., Favorito R., Di Napoli A., Grimaldi M.C., Ferrandino I., Melluso G.

SCRAPIE NATURALE E SPERIMENTALMENTE INDOTTA PER OS IN OVINI DI RAZZA SARDA:
RECENTI ACQUISIZIONI IN AMBITO PATOGENETICO

Marruchella G., Ligios C., Cancedda M.G., Demontis F., Chiocchetti R., Clavenzani P., Lalatta-Costerbosa Gi., Di Guardo G.

STUDIO RETROSPETTIVO SULLE NEOPLASIE OSSERVATE NEI MAMMIFERI DEL BIOPARCO
DI ROMA NEL PERIODO 1999-2008

Eleni C., Friedrich K.G., Scholl F., Cocumelli C., Sarli Gi., Bacci B., Di Cerbo P., Falchi A., Leonardi L., Ciorba A.

INDICATORI ISTOLOGICI DI MALIGNITA' NEI TUMORI MELANOCITARI UVEALI DEL CANE.

Giudice C., Bonfanti A., Grieco V.

STUDIO PRELIMINARE SULLA MORFOPATOLOGICA TESTICOLARE IN *FELIS CATUS* DOPO
INOCULAZIONE DI CLOREXIDINA DIGLUCONATO

Losacco C., Aiudi G., De Sandro Salvati A., Leone R., Lacalandra G.M., Perillo A.

IPARATOPIE DISCALI IN DICIANNOVE CANI: RISONANZA MAGNETICA (RM) E
ISTOPATOLOGIA

Mandrioli L., Bacci B., Panarese S., Dolera M., Malfassi L., Bombardi C., Bettini G.

SU DI UN CASO DI ANEMIA INFETTIVA EQUINA CON COINVOLGIMENTO DEL TESSUTO
CEREBRALE

Marruchella G., Romanelli P., Marsilio F., Di Guardo G.

ADENOCARCINOMA DEL GROSSO INTESTINO CON METAPLASIA OSSEA IN UN PONY

Morini M., Spadari A., Romagnoli N., Bettini G.

NEFROPATIA GIOVANILE IN UN CANE YORKSHIRE TERRIER: ESAME ISTOLOGICO ED
ULTRAISTRUTTURALE

Palmieri C., Aste G., Boari A., Della Salda L.

QUADRI ANATOMOPATOLOGICI RENALI IN TIGRI (*PANTHERA TIGRIS*)

Pascotto E., Codolo R., Guadagnini D., Magnone W., Sandri C., Galeotti M.

UN METODO DI ANALISI DELLA DISTRIBUZIONE TOPOGRAFICA DI LESIONI NODULARI
CUTANEE NEL CANE

Pascotto E., Tomè P., Zuliani M., Comazzi S., Galeotti M.

UN SINGOLARE TUMORE SPINALE A CELLULE GIGANTI IN UN GATTO

Pavone S., Pintore L., Bernardini M., Mandara M.T.

TRATTAMENTO CON ELETTROCHEMIOTERAPIA DI ALCUNI TUMORI ORALI DEL CANE E
DEL GATTO

Puleio R., Cassata G., Schiavo M.R., Tamburello A., Poli A., Ressel L., Loria G.R.

ESPRESSIONE DI LIPOPOLYSACCHARIDE BINDING PROTEIN IN TESSUTI BOVINI NON
PATOLOGICI.

Md Rahman M., Lecchi C., Sartorelli P., Avallone G., Roccabianca P., Cecilian F.

CORRELAZIONE TRA LESIONI ANATOMO-ISTOPATOLOGICHE E SEGNI CLINICI IN CANI
NATURALMENTE INFETTI DA *LEISHMANIA INFANTUM*

Restucci B., Oliva G., Foglia Manzillo V.



GANGLIONEURITE MIENTERICA IN CORSO DI ENTEROPATIA ENZOOTICA DEL CONIGLIO:
OSSERVAZIONI ISTOLOGICHE ED IMMUNISTOCHEMICHE

Rondena M., Ferrazzi V., Grieco V., Binanti D., Riccaboni P., Gallazzi D., Grilli G.

RISULTATI PRELIMINARI SU ATTIVITA' SIALILTRANSFERASICA ED ACIDO SIALICO IN
SIERO E TESSUTI DI CANI SANI E CON NEOPLASIE MAMMARIE

Rossi G., Meregalli A., Rondena M., Moretti P., Pecile A., Paltrinieri S.

COLIBACILLOSI DEL VITELLO: INDAGINE MORFOLOGICA ED IMMUNOFENOTIPICA SULLA
DISTRIBUZIONE DI *ESCHERICHIA COLI* IN RELAZIONE ALLO STATO IMMUNITARIO DI
VITELLI DECEDUTI IN CORSO DI PATOLOGIA ENTERICA SPONTANEA

Rondena M., Binanti D., Morandi N., Pollera C., Finazzi M., Riccaboni P.

CLASSIFICAZIONE E PREVALENZA DI LESIONI INTRAEPITELIALI MAMMARIE NEL CANE IN
ASSENZA DI NEOFORMAZIONI CLINICAMENTE PALPABILI

Mouser P., Miller M.A., Antuofermo E., Badve S.S., Mohammed S.I.

LE PATOLOGIE CUTANEE IN CETACEI SPIAGGIATI LUNGO LE COSTE PUGLIESI

Passantino Giuseppe, Tinelli Antonella, Cascone Valeria, Lo Presti Giuseppe, Zizzo Nicola

Facoltà di Medicina Veterinaria – Università degli studi di Bari. Dipartimento di Sanità e Benessere Animale. Strada Prov. per Casamassima Km.3. 70010 Valenzano (Bari)

Nei Cetacei la cute, liscia e priva di peli, è spesso 10-20 volte di più rispetto a quella dei mammiferi terrestri ed è formata da tre strati: basale o germinativo, spinoso ed esterno. La sua funzione è quella di mantenere l'omeostasi e di proteggere l'animale dagli insulti ambientali anche se vulnerabile ad attacchi di origine traumatica, microbica, virale, parassitaria e micotica.

In questa sede riferiremo le principali alterazioni riscontrate in cetacei spiaggiatisi lungo le coste pugliesi ed esaminati presso la sala necroscopica del Dipartimento di Sanità e Benessere Animale. Le indagini eseguite su n°155 soggetti appartenenti alle specie: *Tursiops truncatus*, *Stenella coeruleoalba*, *Grampus griseus*, *Ziphius cavirostris*, di ambo i sessi, giovani ed adulti hanno permesso di evidenziare:

- Contusioni, abrasioni ed escoriazioni conseguenti allo spiaggiamento;
- Strie lineari irregolari causate dall'impigliamento nelle reti dei pescatori;
- Recisione della coda e delle pinne;
- Perforazioni e ferite da arma da fuoco o da corpi appuntiti;
- Soluzioni di continuo complicate da infezioni batteriche spesso sfocianti in lesioni nodulari-nodose a contenuto purulento;
- Alterazioni di tipo eritematoso-pustoloso;
- Aree necrotiche;
- Infestioni parassitarie (*Pennella* sp., *Phyllobothrium delphini*, *Crassicauda* sp.);
- Formazioni circolari simil-pomfoidi della grandezza massima di una lenticchia.

Parole chiave: patologia, cute, cetacei

SKIN DISEASES IN CETACEANS BEACHED ALONG THE COASTS OF PUGLIA

The skin of cetaceans, smooth and free of hair, thick is 10-20 times more than that of land mammals and consists of three layers: basal or germinative, thorny and external. Its function is to maintain homeostasis and to protect the animal from environmental insults, although vulnerable to attacks of traumatic origin, microbial, viral, parasitic and fungal.

Here refer to the main alterations found in beached whales along the coasts of Puglia and examined at the necropsy room of the Department of Animal Health and Welfare. The investigations carried out on n ° 155 subjects belonging to the species: *Tursiops truncatus*, *Stenella coeruleoalba*, *Grampus griseus*, *Ziphius cavirostris*, both sexes, young people and adults have revealed:

- Crushing, abrasions and excoriations resulting coastal crash;
- Irregular linear strip caused to entanglement in the fishing net of the fishermen;
- Excision of the tail and fins;
- Drilling and bullet wounds or from the bodies sharp;
- Solutions continually complicated by bacterial infections, often leading to injuries nodularity-knotted content purulent;
- Changes of pustular-type erythematosis;
- Necrotic areas;
- Parasitic infestation (*Pennella* sp., *Phyllobothrium delphini*, *Crassicauda* sp.);
- Circular formations like-hives the maximum size of a lentil.

Key word: pathology, skin, cetaceans

STUDIO ISTOPATOLOGICO DI *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* NELLE ACQUE CAMPANE

Carella F.^a, De Vico G.^a

^a Dipartimento delle Scienze Biologiche, Università degli Studi di Napoli Federico II, via Mezzocannone, 8, 80134, Napoli

La mitilicoltura rappresenta un importante settore dell'acquacoltura Italiana, che raggiunge le 1,298 t/anno di prodotto, in Campania. A tutt'oggi, scarsi sono i dati sullo stato di salute dei molluschi allevati nel sud d'Italia; per tale motivo ci è parso opportuno, nel corso dell'anno 2008, monitorare mediante esame istopatologico, lo stato di salute della specie *Mytilus galloprovincialis* in quattordici siti campani comprendenti sia allevamenti situati in aree classificate come A e B (Reg. CEE 854/2004), che alcuni punti vendita non autorizzati, in una fascia territoriale di competenza di diverse ASL delle Province di Caserta, Napoli e Salerno, rispettivamente. Trenta individui per sito sono stati sottoposti ad analisi istopatologiche, che hanno evidenziato la presenza di organismi simbiotici fra cui: 1) Protozoi Ciliati appartenenti al gruppo dei Rhynchodid-like *Phyllopharyngea* e *Ancystrum* sp.; 2) Idrozoi del genere *Eugymnantea* e 3) Coccidi come *Pseudloklossia* sp. Fra i parassiti: 1) Metazoi del gruppo delle Cercarie, 2) Gregarinidi del genere *Nematopsis* e 3) Microsporidi come *Sthienhausia mytilovum*. Le lesioni sono state inoltre suddivise in processi patologici a carattere difensivo, regressivo e progressivo, rispettivamente, in accordo con i dettami della Patologia Generale Comparata. Tale osservazione preliminare ha stimato che fenomeni di tipo infiammatorio e degenerativo, associati o meno a parassiti, sono presenti nella maggior parte delle aree campionate, ma con minore prevalenza nelle aree di tipo A. L'esame istopatologico si conferma come utile strumento diagnostico nella valutazione dello stato di salute degli animali acquatici, in grado di fornire alle industrie e agli organi di governo informazioni utili ad apportare, attraverso una corretta osservazione delle patologie, eventuali modifiche alle misure di gestione degli allevamenti e dei banchi naturali.

Parole chiave: *Mytilus galloprovincialis*, istopatologia, costa campana

HISTOPATHOLOGICAL STUDY OF *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* IN THE CAMPANIAN WATERS

The farming of mussels has an important tradition in Italy with an significant commercial industry along Campanian coast reaching 1,298 t for year. Data on health status of mollusc in the South of Italy are scarce; in this context, during 2008, takes place a monitoring program of the most economically important bivalve *Mytilus galloprovincialis* species. Thirty mussels have been collected in from each of the 14 areas monitored, including Caserta, Naples and Salerno districts, classified as areas A, B and no authorized market point. Histopathology showed the presence of symbionts - Ciliates Protozoa Rhynchodid-like *Phyllopharyngea* and *Ancystrum* sp, Idrozoa *Eugymnantea* sp. and Coccidian as *Pseudloklossia* sp.. - and parasites like Metazoan *Cercaria* sp, Gregarines like *Nematopsis* sp. and Microsporidian *Sthienhausia mitilovum*. Beside this, tissue alteration have been subdivided in defensive, regressive and progressive processes. Our results indicate that stress responses, like defensive, degenerative processes and parasites, were represented in almost all the sampled sites, but less prevalent in A areas. Histology is a widely used screening tool for the general health of aquatic animals enables the industry and government bodies to maintain a close watch on the disease status of the aquaculture industry, and discover outbreaks of disease early so effective management procedures can limit the spread of such diseases.

Key words: *Mytilus galloprovincialis*, histopathology, Campanian coast

ISTIOCITOSI PROGRESSIVA FELINA: ASPETTI MORFOLOGICI ED IMMUNOCITOCHIMICI DI UN CASO

Sforna Monica¹, Brachelente Chiara¹, Lepri Elvio¹, Capuccini Silvia¹, Pinto da Cunha Nazaré², Mechelli Luca¹

¹Dipartimento di Scienze Biopatologiche ed Igiene delle Produzioni Animali e Alimentari – Università degli Studi di Perugia. Via S. Costanzo, 4 06128 Perugia. ²Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria. Università degli Studi di Milano. Via Celoria, 10 20133 Milano

L'istiocitosi progressiva felina rappresenta un disturbo proliferativo istiocitario a lento decorso, ancora non completamente definito, con possibile metastatizzazione ai linfonodi regionali e agli organi interni. Il caso descritto si riferisce ad un gatto europeo, femmina sterilizzata di 13 anni. La dermatopatia era caratterizzata da noduli multipli di circa 2-4 mm di diametro, eritematosi, parzialmente ulcerati, insorti alla base dei padiglioni auricolari e associati a prurito intenso. Le lesioni erano insorte circa 1 anno e 4 mesi fa mostrando, fino ad oggi, un andamento altalenante e progressivo, raggiungendo 2 cm di diametro circa e coinvolgendo entrambe le regioni temporali. Sono stati eseguiti esami citologici e campionamenti per esami micologici e batteriologici. I preparati citologici mostravano una discreta cellularità con una prevalenza di cellule rotonde con nucleo ovale, nucleoli non evidenti e citoplasma abbondante debolmente basofilo associate a cellule giganti multinucleate e rari granulociti neutrofili. La popolazione prevalente, compatibile con cellule macrofagico-istiocitarie, era piuttosto monomorfa e non presentava caratteri spiccati di atipia; la lesione, pertanto, poteva essere compatibile con un processo di tipo infiammatorio piogranulomatoso o con un tumore a cellule rotonde ben differenziato. Gli esami batteriologici e micologici avevano dato esito negativo. Sono stati eseguiti prelievi biotici dei noduli per esame istopatologico ed ultrastrutturale. L'esame istopatologico mostrava la presenza di un infiltrato diffuso di cellule macrofagiche, prevalentemente di aspetto istiocitario, nel derma superficiale e profondo, frammisto ad un numero inferiore di cellule giganti multinucleate, linfociti e granulociti neutrofili compatibile con dermatite piogranulomatoso o con un disordine proliferativo istiocitario. Su strisci non colorati è stata fatta una valutazione immunocitochimica con markers della linea macrofagica e dendritica che hanno definito il fenotipo cellulare CD1a⁺, CD1c⁺, CD11b⁺, riferibile alla linea dendritica. Le indagini ultrastrutturali non hanno consentito di evidenziare la presenza dei granuli di Birbeck, strutture citoplasmatiche tipiche delle cellule del Langerhans. Le rx toraciche e l'ecoaddome non hanno mostrato lesioni a carico degli organi interni. I risultati ottenuti in relazione all'andamento clinico della malattia hanno consentito di formulare la diagnosi di istiocitosi progressiva felina. Tale condizione, di raro riscontro nel gatto, non trova pareri concordi sull'esatta derivazione cellulare. I nostri risultati, in particolare ultrastrutturali caratterizzati dall'assenza dei granuli di Birbeck, supportano l'origine dendritica interstiziale della malattia.

Parole chiave: gatto, istiocitosi progressiva, cellule dendritiche, granuli di Birbeck

MORPHOLOGICAL AND IMMUNOCYTOCHEMICAL FINDINGS IN A CASE OF FELINE PROGRESSIVE HISTYOCITOSIS

Feline progressive histiocytosis represents a slowly progressive disease of histiocytic origin, still not completely defined, with possible involvement of lymph nodes and internal organs. Alopecic, pruritic ear nodules were detected in a 13-years-old, female, shortaired cat. Cytologic and histopatological findings were suggestive of pyogranulomatous disease or histiocytic proliferative disease. Immunocytology performed with CD1a, CD1c and CD11b and ultrastructural investigations confirmed the histiocytic disorder and suggest the interstitial dendritic cell origin.

Key words: cat, progressive histiocytosis, dendritic cells, Birbeck's granules

COLLAGENOSI PERFORANTE IN UN GATTO

Brachelente Chiara, Sforza Monica, Lepri Elvio, Capuccini Silvia

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

In medicina umana, con il termine generico di dermatosi perforanti, vengono comprese un gruppo di dermatosi caratterizzate dalla formazione di papule ombelicate con un “tappo corneo” centrale e causate dall’eliminazione transepidermica di materiale dermico alterato (collagene o elastina). Da un punto di vista clinico ed istopatologico queste malattie vengono classificate, sulla base della tipologia di lesione, di distruzione epidermica e sulla natura del materiale eliminato, in 4 forme principali: l’elastosis perforans serpiginosa (EPS), la collagenosi perforante reattiva (CPR), la malattia di Kyrle (MK) e la follicolite perforante (FP). La EPS e la CPR possono comparire sia in forma ereditaria che acquisita, mentre la MK e la FP sono nella maggior parte dei casi acquisite. Alla base della patogenesi di questo gruppo di malattie vi è un’anomalia ed un danno focale del collagene seguiti dall’eliminazione del collagene distrutto attraverso l’epidermide. Fattori precipitanti possono essere rappresentati dalle basse temperature e da traumi smussi, specialmente nel caso delle forme ereditarie. Nelle forme acquisite, invece, gli eventi concomitanti più frequentemente associati sono rappresentati da diabete, insufficienza renale od altre malattie sistemiche. Per quanto riguarda le cause, queste non sono esattamente definite ma si pensa giochi un ruolo una risposta anomala a traumi superficiali, quali per esempio il grattamento.

In medicina veterinaria la dermatite perforante (collagenosi perforante) rappresenta una malattia rara e descritta ad oggi soltanto in due gatti. L’opinione più diffusa è che la dermatite perforante si manifesti nell’ambito di reazioni autotraumatiche secondarie a malattie cutanee allergiche. Il nostro caso si riferisce ad un gatto, comune europeo, maschio, di 3 mesi, che presentava lesioni pruriginose, multifocali-confluenti, sulla faccia esterna della regione radio ulnare destra ed all’interno del padiglione auricolare destro. Tali lesioni avevano un aspetto rotondeggiante, margini netti e superficie ricoperta da materiale scaglioso crostoso di colore giallo brunastro. L’aspetto istologico era caratterizzato dalla presenza di croste colonnari confluenti contenenti detriti cellulari frammisti a numerose fibre collagene di aspetto degenerato; tali fibre erano orientate in maniera perpendicolare alla superficie epidermica adiacente intatta. Nel derma sottostante si evidenziava un marcato infiltrato infiammatorio costituito da granulociti eosinofili e mastociti, con rari macrofagi e linfociti. La colorazione tricromica di Masson ha consentito di evidenziare la presenza di porzioni centrali rossastre all’interno di fibre collagene degenerate, in contrasto alla colorazione omogeneamente blu delle fibre collagene normali. Anche nel nostro caso le lesioni non erano associate alla presenza di altri segni di malattia sistemica e si sono risolte nell’arco di 2 settimane dopo terapia antibiotica per via orale.

Parole chiave: gatto, dermatopatologia, collagenosi perforante

PERFORATING COLLAGENOSIS IN A CAT

Perforating dermatoses include a group of diseases characterized by skin perforation with external elimination of material of dermal derivation. In human medicine they are more commonly associated with systemic diseases such as diabetes and renal failure, whereas in veterinary medicine only two cases in cats have been reported with no associated underlying disorders. We report the case of a cat with clinical and dermatopathological lesions reminiscent of perforating collagenosis described in humans.

Key words: cat, dermatopathology, perforating collagenosis

MORTE IMPROVVISA NEL CAVALLO: UN LABIRINTO DIAGNOSTICO

Lepri Elvio, Passamonti Fabrizio*, Sforza Monica, Brachelente Chiara, Leonardi Leonardo, Vitellozzi Giovanni

*Dipartimento di Scienze Biopatologiche ed Igiene delle Produzioni Animali ed Alimentari – Sezione di Patologia e Igiene Veterinaria; *Dipartimento di Patologia, Diagnostica e Clinica Veterinaria – Sezione di Scienze Sperimentali e Biotecnologie Applicate - Facoltà di Medicina Veterinaria di Perugia*

La morte improvvisa o inaspettata nel cavallo è un evento relativamente comune che può essere dovuto a cause molteplici, per la cui identificazione è necessario un corretto e metodico approccio; ciononostante una elevata percentuale di casi, variabile a seconda delle casistiche tra il 30% e il 68%, resta non diagnosticato. Scopo del lavoro è riportare il caso di cinque cavalli venuti a morte improvvisamente nell'arco di un anno in un maneggio situato in provincia di Siena. Gli animali facevano parte di un più ampio gruppo di circa 20 soggetti di razza, età, sesso ed attitudine diversa, tutti alimentati con lo stesso alimento ed acqua; l'unico elemento che differenziava gli animali deceduti dagli altri soggetti era rappresentato dall'area esterna recintata cui i soggetti deceduti avevano accesso. Le morti si sono verificate nel periodo autunnale tra ottobre e novembre (4 soggetti), uno soltanto in febbraio. Gli animali sono stati trovati morti (1 soggetto) o visti morire (4 soggetti) con una sintomatologia iperacuta aspecifica caratterizzata da abbattimento, dispnea, cianosi delle mucose apparenti e collasso, con durata variabile da 20' ad 1h. I reperti macroscopici erano aspecifici rappresentati da congestione poliviscerale, emorragie puntiformi e soffiusioni in laringe e vie aeree (5 casi), edema ed emorragie polmonari (2 casi) ed emorragie puntiformi disseminate (3 casi). Istologicamente erano inoltre evidenti modici fenomeni degenerativi renali ed epatici, ed edema intercellulare miocardico. Da tutti gli animali sono stati eseguiti esami batteriologici in aerobiosi ed anaerobiosi, e virologici per escludere le principali malattie infettive virali del cavallo, comprendendo anche malattie non comuni o esotiche (EHV-1/4, AIE, AVE, West Nile Encephalitis, peste equina), risultati negativi. Dall'emocoltura di 4 soggetti venne isolato un *Bacillus* successivamente identificato come *B. licheniformis*. Dal contenuto gastrico di due soggetti venivano eseguiti esami tossicologici nei confronti dei più comuni tossici ad uso doloso (strychnina, pesticidi, carbammati). Inoltre l'alimento veniva esaminato per rilevare la presenza di metalli pesanti e micotossine, ed aliquote di terreno ed acque, provenienti dall'area di pascolo degli animali, venivano testati per valutare la composizione in elementi minerali, senza evidenziare modificazioni significative. Ulteriori esami tossicologici più approfonditi eseguiti su sangue, urine e contenuto gastrico, permisero di escludere la presenza di contaminazioni da sostanze esogene, compresi glicosidi cardioattivi. Nonostante le indagini eseguite, la causa di morte degli animali resta tuttora non identificata. Sulla base dei dati epidemiologici, clinici ed anatomopatologici si può supporre un collasso cardiaco acuto da sostanza tossica non identificata.

Parole chiave: cavallo, morte improvvisa; intossicazione; avvelenamento

SUDDEN DEATH IN THE HORSE: A DIAGNOSTIC DILEMMA

Sudden or unexpected death is a relatively common event in the horse; nevertheless, despite thorough investigation, the cause often remain unknown. We report of five adult horses found dead (1 cases) or suddenly dead under the owner's observation (4 cases) in a farm near Siena. Gross and histological lesions were aspecific; extensive microbiological and toxicological investigation failed to identify a precise cause for the deaths that still remain undetermined, even if an acute cardiac collapse due to exogenous poisoning seems likely.

Key words: horse, sudden death; toxicity; poisoning

STUDIO ISTOPATOLOGICO SUL MUSCOLO DI CANI ANZIANI

**Costagliola Alessandro, Pagano Teresa Bruna, Trapani Francesca, Martano Manuela,
Papparella Serenella, Paciello Orlando**

*Dipartimento di Patologia e Sanità animale – settore di Anatomia Patologica. Università degli
Studi di Napoli Federico II*

Alcune delle più gravi conseguenze dell'invecchiamento sugli esseri viventi, sono i suoi effetti sul muscolo scheletrico.

Il presente lavoro descrive gli aspetti istopatologici di campioni bioptici di muscoli scheletrici prelevati da 10 cani anziani che presentavano normale attività fisica rapportabile all'età, nessuna malattia cronica invalidante e nessun disordine neuromuscolare clinicamente evidente, confrontati con quelli di campioni bioptici prelevati da cani di giovane età anch'essi in apparente buono stato di salute. Le biopsie sono state congelate in isopentano preraffreddato in azoto liquido e successivamente sono state studiate con le metodiche istologiche ed istoenzimatiche che di routine vengono eseguite presso il nostro laboratorio. Le diverse colorazioni hanno permesso di evidenziare numerose alterazioni comuni a tutti i campioni bioptici prelevati nei cani anziani. La colorazione Ematossilina Eosina mostrava la presenza di nuclear clumps e diverse fibre atrofiche, anche con profili angolari, singole e in gruppi più o meno grandi. La Tricromica di Engel svelava fibre "Ragged Red" e all'interno del sarcoplasma la presenza di corpi nemalinici. Le colorazioni istoenzimatiche NADH-DR ed SDH evidenziavano la presenza di fibre lobulate e fibre target, mentre con la COX era possibile osservare diverse fibre negative. La colorazione ATPase a pH 9.4 e a pH 4.3 mostrava un'atrofia sia delle fibre di tipo I che delle fibre di tipo II.

Questi reperti suggeriscono che nel cane, l'invecchiamento è responsabile, attraverso diversi meccanismi, di numerosi danni al tessuto muscolare. Il quadro di lieve atrofia da denervazione potrebbe essere causato, così come avviene nell'uomo, dalla progressiva degenerazione dei motoneuroni che non viene totalmente compensata dal fenomeno di reinnervazione. Il nostro lavoro può essere un punto di partenza per lo studio delle basi molecolari delle alterazioni muscolari dovute all'invecchiamento.

Parole chiave: muscolo, invecchiamento, sarcopenia, cane

HISTOPATHOLOGICAL STUDY ON THE MUSCLE OF OLDER DOGS

Some of the most serious consequences of the population are its effects on skeletal muscle.

This study describes the histopathological aspects of biopsy samples of skeletal muscle taken from 10 elderly dogs compared with those of biopsy samples taken from young dogs in apparent good health. The biopsies were studied with histological methods and istoenzimatiche that are routinely performed at our laboratory. The different colors have revealed several abnormalities common to all the biopsy samples taken in older dogs. Haematoxylin eosin staining showed the presence of nuclear clumps and several atrophic fibers, with angular profiles, single and in groups. The Engel Tricrome revealed "Ragged Red Fibers" and within the sarcoplasma the presence of nemalinic bodies. The NADH-DR and SDH stains showed the presence of lobular fibers and target fibers, and with COX stain was possible to observe several negative fibers. ATPase staining at pH 9.4 and pH 4.3 showed both type I and type II muscle fibers atrophy.

These findings suggest that in dogs ageing is responsible, through different mechanisms, of many damage to muscle tissue. The framework for mild atrophy by denervation could be caused, as is done in humans, by the progressive degeneration of the motor that is not fully compensated by the phenomenon of reinnervazione. Our work can be a starting point for studying the molecular basis of muscular alterations due to aging.

Key words: muscle, aging, sarcopenia, dog

MIOPATIE INFIAMMATORIE IN BOVINI ANZIANI: UN MODELLO PER L'INCLUSION BODY MYOSITIS?

Trapani Francesca, Costagliola Alessandro, Iovane Valentina, Roperto Franco, Papparella Serenella, Paciello Orlando

¹Dipartimento di Patologia e Sanità animale – settore di Anatomia Patologica. Università degli Studi di Napoli Federico II

La miosite a corpi inclusi (IBM) è una miopatia infiammatoria progressiva caratterizzata clinicamente da atrofia e debolezza muscolare descritta fino ad ora solo nell'uomo. L'eziopatogenesi è sconosciuta e pertanto non ci sono trattamenti terapeutici efficaci. Gli aspetti caratteristici dell'IBM sono la degenerazione intrafibrillare, responsabile della distruzione della fibra muscolare, e l'infiltrazione endomisiale di cellule mononucleate. Istologicamente, le fibre muscolari mostrano vacuoli intramiofibrillari, al cui interno si osserva accumulo del precursore proteico dell'amiloide β e dei suoi frammenti proteolitici e accumulo di aggregati multi-proteici. Inoltre si osserva la presenza di un infiltrato infiammatorio, prevalentemente linfociti CD8 e alterazioni dei mitocondri, come testimoniato dalla presenza di "Ragged Red Fibres" e fibre negative alla colorazione per la citocromo ossidasi (COX).

In questo studio abbiamo indagato, con tecniche di istoenzimatica, immunoistochimica ed immunofluorescenza, 12 biopsie muscolari di bovini anziani che mostravano marcata atrofia muscolare e debolezza muscolare. I risultati ottenuti mostrano la presenza di accumuli intramiofibrillari positivi alla colorazione per l'amiloide (Congo Red), positività agli anticorpi anti-ubiquitina e anti E610. L'infiltrato infiammatorio, che si riscontra nelle biopsie muscolari, era composto da una predominanza di linfociti CD8 e macrofagi. Inoltre, sia in presenza che in assenza di infiltrato infiammatorio si è rilevata la positività delle fibre al complesso maggiore di istocompatibilità di classe I. Inoltre sono state osservate numerose Ragged Red Fibers e fibre COX negative. Questi dati suggeriscono che ci sono molte analogie tra l'IBM dell'uomo e la patologia da noi studiata nel bovino e ci spinge ad approfondire gli studi per evidenziare ulteriori similitudini nei meccanismi patogenetici così da poter ottenere un modello per la patologia umana.

Parole chiave: miosite a corpi inclusi, complesso maggiore di istocompatibilità di classe I, bovino

INFLAMMATORY MYOPATHY IN AGED CATTLE: A MODEL FOR INCLUSION BODY MYOSITIS?

Inclusion-body myositis (IBM), is a progressive inflammatory skeletal muscle disease, most common in older persons, of unknown cause and lacks successful treatment. IBM is also a degenerative muscle disease, occurring within an aged muscle cellular environment, Histologically characterized by muscle-fibers showing vacuolization and atrophy, accumulation of intra-muscle-fiber multiprotein aggregates contain proteins that are congophilic, indicating pleated-sheet configuration of amyloid and also contain other proteins having a propensity to misfold. Also characteristic component of s-IBM muscle biopsies is a lymphocytic inflammation, mainly composed of cytotoxic CD8 cells and mitochondrial abnormalities, these include: ragged-red fibers and cytochrome-coxidase (COX) negative muscle fibers.

We study 12 biopsies from older cattle with muscle atrophy and weakness. The results show inclusions, within muscle fibres, positive for amyloid (Congo Red), ubiquitin and E610 antibodies. The inflammatory infiltrates, was composed of CD8⁺ lymphocytes and macrophages. Furthermore, both in presence and absence of inflammatory infiltrates was detected positive muscle fibers for Major histocompatibility complex class I. Were also observed numerous Ragged Red Fibers and COX negative fibers. These data suggest that there are many similarities between the IBM and the disease that we studied in cattle, and urges us to deepen the studies to highlight further similarities in the pathogenetic mechanisms so as to obtain a model for human disease.

Key words: Inclusion-body myositis, histocompatibility complex class I, cattle

RILIEVI ANATOMO-ISTOPATOLOGICI IN TOPI P27 KNOCK-IN T197A

Iovane Valentina¹, De Marco Carmela², Forzati Floriana², Scarfò Marzia², Fusco Alfredo²,
Trapani Francesca¹, Paciello Orlando¹, Viglietto Giuseppe², Papparella Serenella¹

¹Dipartimento di Patologia e Sanità animale – settore di Anatomia Patologica. Università degli Studi di Napoli Federico II. ²Laboratorio di Oncologia Molecolare, BioGem s.c. a r.l., Ariano Irpino (AV), Italy

Le chinasi ciclina-dipendenti (CDK), assieme alle rispettive subunità regolatrici, le cicline, sono regolatori positivi della progressione del ciclo cellulare nelle cellule eucariote. La p27 è un regolatore negativo del ciclo cellulare, è una piccola proteina di circa 23kDa, normalmente espressa in quasi tutti i tessuti umani.

La p27 è generalmente elevata in cellule quiescenti e si riduce in seguito alla stimolazione mitogenica. Il ruolo che svolge la p27 nei tumori epiteliali è da definire. La riduzione della P27 è associata a uno sviluppo di tumori epiteliali che originano da polmoni, colon, esofago, ovaio, tiroide e prostata. La scarsa presenza o assenza dell'espressione della P27, rappresenta un importante marker della progressione della malattia neoplastica. In diverse neoplasie l'alterazione principale di p27 risiede nella sua delocalizzazione dal nucleo al citoplasma.

Scopo del lavoro è stato quello di caratterizzare attraverso l'esame macroscopico e microscopico il fenotipo di topi "knock in" per p27. Abbiamo esaminato 8 topi mutati e 7 controlli. Macroscopicamente, i topi "knock in" per p27, mostravano aumento di volume e di peso di tutti gli organi rispetto ai controlli. Microscopicamente le lesioni più significative erano osservabili nell'utero, con iperplasia ghiandolare ed iperplasia della muscolare, e nell'intestino, con lesioni iperplastiche osservate a carico delle cripte ghiandolari. A carico del tessuto linfoide, si osservava, inoltre, atrofia soprattutto del tessuto linfoide associato alle mucose (MALT).

I risultati ottenuti, seppure preliminari, indicano un coinvolgimento della p27 soprattutto nelle cellule epiteliali e linfoidi. Studi ulteriori sull'espressione e localizzazione della proteina nei topi mutati sono ancora in corso.

Parole chiave: p27, chinasi ciclina-dipendenti, topi

ANATOMO-HISTOPATHOLOGICAL FINDINGS IN MICE P27 KNOCK-IN T197A

The cyclin-dependent kinase (CDK), along with their regulatory subunits, the cyclins, are positive regulators of cell cycle progression in eukaryotic cells. The p27 is an inhibitor of the family Cip / Kip and is a negative regulator of cell cycle, is a small protein of about 23kDa, normally expressed in almost all human tissues.

The p27 is generally high in quiescent cells and decreases in response to mitogenic stimulation. The role that p27 plays in the epithelial cancer is to be defined. The reduction of p27 is associated with the development of epithelial tumors originating from lung, colon, esophagus, ovary, thyroid and prostate. The reduction or the absence of the expression of p27, is an important marker of neoplastic progression.

The aim of the study was to characterize the phenotype of mice "knock in" for p27, by examining the macroscopic and microscopic lesions. We examined 8 mutated mice and 7 controls. Macroscopically, the mice "knock in" for p27 showed increased volume and weight of all organs compared with controls. Microscopically the lesions were more significant in the uterus, with glandular hyperplasia and hyperplasia of smooth muscle, and in intestine with hyperplastic lesions of glandular crypts. An atrophy of lymphoid tissue, was noted, especially atrophy of mucosa associated lymphoid tissue (MALT).

These results, although preliminary, indicate a particular involvement of p27 in epithelial and lymphoid cells. Further studies on expression and localization of the mutated protein in mice are ongoing.

Key words: p27, cyclin-dependent kinase, mice

MODULAZIONE *IN VITRO* DELLA FAGOCITOSI E DELLA PRODUZIONE DI SPECIE REATTIVE DELL'OSSIGENO (ROS) DI NEUTROFILI CAPRINI IN PRESENZA DI ACIDI GRASSI Ω -3 POLINSATURI (EPA E DHA)

~~*In vitro* modulatory effect of ω -3 polyunsaturated fatty acid (EPA and DHA) on phagocytosis and Reactive Oxygen Species (ROS) production of goat neutrophils~~

Pisani Laura Francesca^a, Lecchi Cristina^a, Dilda Francesca^a, Invernizzi Guido^b, Agazzi Alessandro^b, Sartorelli Paola^{ac}, Savoini Giovanni^{bc}, Cecilianì Fabrizio^{ac}

^a *Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Università degli Studi di Milano, via Celoria 10, 20133 Milano, Italy.* ^b *Dipartimento di Scienze e Tecnologie Veterinarie per la Sicurezza Alimentare, Università degli Studi di Milano, via Celoria 10, 20133 Milano, Italy*
^c *CISMA – Centro Interdipartimentale di Studi sulla Ghiandola Mammaria*

È ormai accertato che lo stato nutrizionale è un fattore importante nella risposta immunologica. Gli acidi grassi polinsaturi (PUFA) sono in grado di svolgere un ruolo considerevole nella modulazione e regolazione del processo infiammatorio. Considerando la potenzialità nutraceutica di queste molecole, due PUFA a catena lunga, l'acido eicosapentanoico (EPA) e l'acido docosaesanoico (DHA), presenti nell'olio di pesce, sono in grado di influenzare la composizione dei fosfolipidi di membrana dei leucociti, l'espressione delle molecole di adesione, la sintesi di citochine infiammatorie, la fagocitosi e la produzione di Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS). La supplementazione di olio di pesce o di EPA e DHA nella dieta ha quindi destato notevole interesse nell'ambito dell'alimentazione animale.

Lo scopo di questo lavoro è quello di valutare l'attività immunomodulatoria degli acidi grassi EPA e DHA sia sulla fagocitosi sia sulla produzione di ROS di neutrofili caprini.

I neutrofili di 12 capre (Saanen) sane sono stati purificati a partire da sangue intero mediante stratificazione su Percoll e successiva lisi dei globuli rossi.

La fagocitosi è stata studiata aggiungendo ai neutrofili, dopo 3 ore di incubazione con EPA o DHA a concentrazioni comprese tra 0 e 200 μ M, *Escherichia coli* coniugato con fluoresceina; la fluorescenza emessa dalle particelle fagocitate è stata misurata dopo 2 ore.

La produzione di ROS è stata valutata mediante il test di riduzione del citocromo c, incubando i neutrofili per 2 ore in RPMI-1640 in presenza di EPA o DHA a concentrazioni comprese tra 0 e 200 μ M.

La fagocitosi è significativamente aumentata dopo la somministrazione di EPA ($P < 0.05$) e di DHA ($P < 0.01$) già a partire dalla concentrazione di 25 μ M.

Il trattamento con EPA non influenza la produzione extracellulare di ROS anche a concentrazioni elevate di acido grasso, mentre è ridotta dal DHA a concentrazione di 25 μ M ($P < 0.01$) e per le concentrazioni comprese fra 50 e 200 μ M ($P < 0.05$). L'effetto è aumentato in condizioni che simulano uno stato infiammatorio indotto dall'incubazione con Forbolo 12-miristato-13-acetato (PMA).

Questo studio mostra come EPA e DHA possano avere effetti positivi sui neutrofili aumentando l'attività fagocitaria e contemporaneamente, riducendo il danno tissutale dovuto al rilascio di ROS.

Parole chiave: neutrofili, PUFA, fagocitosi, ROS, capra

INTRODUZIONE

I neutrofili sono componenti essenziali della risposta immunitaria innata, e contribuiscono in modo essenziale alla difesa nei confronti di batteri e miceti, fagocitando gli agenti patogeni ed esponendoli all'azione distruttiva di molecole neo-sintetizzate, come le Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS), oppure conservate in granuli preformati (Borregaard and Cowland, 1997). I neutrofili rappresentano una delle cause maggiori di distruzione dei tessuti, qualora la loro azione non sia regolata in modo efficiente (Smith, 1994).

Gli acidi grassi introdotti con la dieta sono in grado di modulare la risposta immunitaria (Calder, 2002). I più potenti sono gli acidi grassi polinsaturi ω -3 (ω -3 PUFAs) (Simopoulos, 2002), e fra loro quelli derivati dall'olio di pesce, l'acido eicosapentaenoico (EPA) ed il docosaesaenoico (DHA) (Calder, 2006). I PUFA agiscono sostituendo l'acido arachidonico come substrati per la sintesi degli eicosanoidi, inibendo così il metabolismo dell'acido arachidonico, sia generando una famiglia di molecole anti-infiammatorie, resolvine e protectine (Serhan and Savill, 2005). Da ultimo, gli ω -3 PUFA possono modulare l'espressione di citochine pro-infiammatorie down-regolando l'attivazione di alcuni fattori di trascrizione (Zhao et al., 2005).

I PUFA vengono somministrati ai ruminanti domestici come integratori alimentari nei mangimi per aumentare il loro contenuto nelle derrate alimentari di origine animale, come il latte (Moghadasian, 2008), ma rivestono anche un ruolo positivo sulla sopravvivenza degli embrioni ed il tasso di fertilità riducendo il livello di $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Santos et al., 2008).

I PUFA vengono comunemente utilizzati anche nell'alimentazione delle capre da latte, ma il loro ruolo nella modulazione del sistema immunitario in questa specie non è stato ancora chiarito. È stato riportato che la somministrazione di olio di pesce durante il periparto modifichi il rapporto mononucleati/polimorfonucleati (Agazzi et al., 2004) ma non sono ancora stati studiati gli effetti di EPA e DHA sulle funzioni difensive dei neutrofili, quali esplosione respiratoria e fagocitosi.

MATERIALI E METODI

Preparazione dei PUFA

Le soluzioni madre di DHA e EPA sono state preparate come precedentemente descritto (Zhao G. et al., 2005).

Purificazione dei neutrofili di capra

L'esperimento è stato condotto su 12 capre da latte Saanen in lattazione, fra 5 ed 6 anni di età, e fra le 30 e 33 settimane dal parto. Da ogni animale sono stati prelevati 35 ml di sangue, e la purificazione dei PMN è stata condotta seguendo il protocollo utilizzato per il bovino e precedentemente pubblicato (Rinaldi et al., 2007). Il numero di cellule è stato determinato utilizzando un contacellule automatico Sysmex XT-2000i. La vitalità e la conta differenziale è stata determinata mediante esclusione del trypan blue e colorazione con Wright.

Misurazione della produzione di ROS

La modulazione della produzione dei ROS è stata studiata mediante saggio di riduzione del citocromo c, come precedentemente riportato nella pecora (Sartorelli et al., 2000). Per simulare un'attivazione pro-infiammatoria, una seconda serie di esperimenti è stata condotta utilizzando PMA (Forbolo 12-miristato-13-acetato) ad una concentrazione di 2.5 $\mu\text{g/mL}$.

Determinazione della fagocitosi

L'opsonizzazione di porzioni di *Escherichia coli* (K-12 strain) fluoresceinati è stata eseguita incubando la sospensione batterica (6×10^8) con 0.5% di siero autologo per 30 minuti. I neutrofili (2×10^5) sono stati quindi incubati per tre ore con concentrazioni crescenti (25, 50, 100 e 200 μM) di EPA e DHA. Le porzioni di *E. coli* (K-12 strain) fluoresceinate, in un rapporto di 30 particelle/cellula, sono state quindi aggiunte ed incubate per le due ore successive. La fluorescenza (eccitazione, λ 494 nm; emissione, λ 518 nm) è stata determinata utilizzando un lettore di fluorescenza Fluoroscanner Ascent (Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finland).

Analisi statistica

L'ANOVA per la produzione dei ROS è stata eseguita utilizzando la procedura MIXED di SAS (SAS/STAT, Version V8.2, 1999-2001, SAS Inst., Inc., NC, USA) (SAS Institute, 2006). I risultati sono stati analizzati utilizzando la produzione iniziale di ROS come covariata. La fagocitosi dei neutrofili incubati con differenti concentrazioni di EPA e DHA è stata analizzata mediante ANOVA utilizzando il General Linear Model of SAS (SAS/STAT, Version V8, 1999,

SAS Inst., Inc., NC, USA). La significatività è stata dichiarata a $P < 0.01$ e $P < 0.05$.

RISULTATI

Effetti di EPA sulla produzione di ROS

I risultati di questa prima serie di esperimenti vengono presentati nella Fig. 1A, dove si evidenzia come l'esplosione respiratoria dei neutrofili non venga influenzata dall'incubazione con EPA, anche quando questo viene utilizzato ad elevate concentrazioni (200 μ M). Quando viene simulata una stimolazione pro-infiammatoria, aggiungendo PMA in questo modello, i risultati non cambiano sostanzialmente, a parte quando viene utilizzata la concentrazione massima a 90 minuti (Fig. 1B).

I risultati presentati in questi esperimenti dimostrano che EPA non ha praticamente effetto nella modulazione della esplosione respiratoria dei neutrofili di capra.

Effetti di DHA sulla produzione di ROS

L'aggiunta di DHA riduce in modo significativo la produzione di ROS dopo 30 minuti (Fig. 2A). Non è evidenziabile apparentemente nessun effetto dose dipendente, anche se la significatività statistica a 25 μ M è più alta ($P < 0.01$) che a 50 μ M, 100 μ M e 200 μ M ($P < 0.05$). Questo effetto è probabilmente ascrivibile alla variabilità individuale. Non è stato individuato nessun effetto statisticamente significativo dopo 60 min di incubazione.

DHA è efficace anche in condizioni sperimentali pro-infiammatorie (Fig. 2B). Quando viene utilizzato ad una concentrazione superiore ai 200 μ M il DHA può ridurre la produzione di ROS a partire dai 30 min di incubazione, anche se le differenze statisticamente significative possono essere evidenziate solo a 30 e 90 minuti. Differenze significative ($P < 0.05$) possono essere riscontrate anche con concentrazioni di 25 e 50 μ M dopo 90 minuti di incubazione. Si può osservare una diminuzione dopo 60 e 120 minuti di incubazione, particolarmente evidenti quando i neutrofili vengono trattati con 200 μ M DHA.

I risultati di questi esperimenti evidenziano che DHA può down-regolare l'esplosione respiratoria, in modo particolare in condizioni pro-infiammatorie.

Effetti di EPA e DHA sulla fagocitosi

I risultati di questa seconda serie di esperimenti vengono presentati nella Fig. 3. La coincubazione con EPA (Fig. 3A) up-regola l'attività fagocitaria

dei neutrofili ($P < 0.05$) anche quando viene utilizzata la concentrazione più bassa di acido grasso (25 μ M). Questo effetto non è

dose/dipendente, dal momento che non cambia aumentando la concentrazione di acido grasso. Anche il DHA up-regola la fagocitosi (Fig. 3B), ed anche in questo caso l'azione è statisticamente significativa anche a basso dosaggio.

DISCUSSIONE

I risultati presentati in questo lavoro evidenziano come sia EPA che DHA hanno un effetto positivo sull'attività difensiva dei neutrofili, aumentando la loro capacità fagocitaria, e contemporaneamente riducendo la capacità di produrre ROS a livello extracellulare.

Questi effetti sono particolarmente evidenti in modelli sperimentali pro-infiammatori. La capacità di EPA e di DHA di ridurre la produzione di ROS è stata precedentemente riportata in neutrofili umani (Chen et al., 1994).

Al contrario, sia EPA che DHA hanno dimostrato un'azione up-regolatoria nei confronti della fagocitosi. I dati riportati in letteratura per quanto riguarda i neutrofili umani sono contrastanti, dal momento che sono stati evidenziate sia un'azione inibitoria che una up-regolatoria (Sipka et al., 1989; Akamatsu et al., 1990; Turini et al., 2001). La teoria più comunemente accettata è che l'effetto sia riconducibile all'inclusione di DHA ed EPA nelle membrane dei leucociti. Per quello che riguarda gli esperimenti riportati nel presente lavoro è molto più probabile che l'azione biologica dei PUFA sia da attribuire ad un'azione diretta sulle cellule, dal momento che i tempi di incubazione sono talmente brevi da non essere compatibili con i tempi necessari per l'inclusione nelle membrane (alcune settimane) (Healy et al., 2000).

I risultati presentati in questo lavoro hanno evidenziato come il DHA abbia un'effetto più potente dell'EPA. E' stato già riportato come alcune funzioni vengano maggiormente modulate dal DHA anziché dall'EPA, come per esempio la produzione di citochine pro-infiammatorie (Weldon et al., 2007) oppure l'espressione dell'MHCI (Khair-El-Din et al., 1995). La spiegazione non è chiara, ma è stato ipotizzato che EPA, ma non DHA, possano competere con l'acido arachidonico, agire come substrato per le ciclossigenasi e le lipossigenasi ed essere quindi convertiti ad eicosanoidi (Calder, 2007). E'

comunque ipotizzabile che alcune delle azioni anti-infiammatorie di EPA e DHA vengano esercitate direttamente a livello di espressione genica, che verrebbe modulata mediante l'alterazione del livello redox intracellulare, che a sua volta potrebbe modulare l'azione del NF-kB.

CONCLUSIONI

In conclusione, i risultati di questo lavoro hanno contribuito a chiarire alcuni meccanismi molecolari alla base dell'azione immunomodulatoria degli ω -3 PUFA. L'introduzione di olio di pesce nelle diete, soprattutto di quelli che contengono una concentrazione elevata di DHA, possono quindi non solo migliorare le proprietà dietetiche del latte, ma anche potenziare le difese immunitarie delle capre.

BIBLIOGRAFIA

Agazzi, A., Cattaneo, D., Dell'Orto, V., Moroni, P., Bonizzi, L., Pasotto, D., Bronzo, V., Savoini G., 2004. *Small Rum. Res.* 55, 77-83.
 Akamatsu, H., Komura, J., Miachi, Y., Asada, Y., Niwa, Y., 1990. *J. Invest. Dermatol.* 95, 271-274.
 Borregaard, N., Cowland, J.B., 1997. *Blood* 89 (10), 3503–3521.
 Calder, P.C., 2001. *Lipids* 36, 1007-1024.
 Calder, P.C., 2002. *Proc. Nutr. Soc.* 61(3), 345-358.
 Calder, P.C., 2006. *Am. J. Clin. Nutr.* 83, 1505S-1519S.
 Calder, P.C., 2007. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 77, 327-335.

Chen, L.Y., Lawson, D.L., Mehta, J.L., 1994. *Thromb. Res.* 76, 317-322.
 Healy, D.A., Wallace, F.A., Miles, E.A., Calder, P.C., Newsholm, P., 2000. *Lipids* 35(7), 763-768.
 Kelley, D.S., Hubbard, N.E., Erickson, K.L., 2005. *Adv. Food Nutr. Res.* 50, 101-138.
 Khair-El-Din, T.A., Sicher, S.C., Vazquez, M.A., Wright, W.J., Lu, C.Y., 1995. *J. Immunol.* 154, 1296-1306.
 Moghadasian, M.H., 2008. *Crit Rev. Food Sci. Nutr.* 48(5), 402-410.
 Rinaldi, M., Moroni P., Paape M.J., Bannerman D.D., 2007. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 115, 107-125.
 Sartorelli, P., Paltrinieri, S., Comazzi, S., 2000. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.* 47, 1–8.
 Santos, J.E., Bilby, T.R., Thatcher, W.W., Staples, C.R., Silvestre, F.T., 2008. *Reprod. Domest. Anim.* 43 (Suppl 2), 23-30.
 Serhan, C.M., Savill, J., 2005. *Nature Immunol.* 6(12), 1191-1197.
 Simopoulos, A.P., 2002. *J. Am. Coll. Nutr.* 21(6), 495-505.
 Sipka, S., Dey, I., Buda, C., csongor, J., Szegedi, G., Farkas, T., 1989. *Clin. Immunol. Immunopath.* 52, 257-270.
 Turini, M.E., Crozier, G.L., Donnet-Hughes, A., Richelle, M.A., 2001. *Eur. J. Nutr.* 40(2), 56-65.
 Weldon, S.M., Mullen, A.C., Loscher, C.E., Hurley, L.A., Roche, H.M., 2007. *J. Nutr. Biochem.* 18, 250-258.
 Zhao, G., Etherton, T.D., Martin, K.R., Vanden Heuvel, J.P., Gillies, P.J., West, S.G., Kris-Etherton, P.M., 2005. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 336, 909-917.

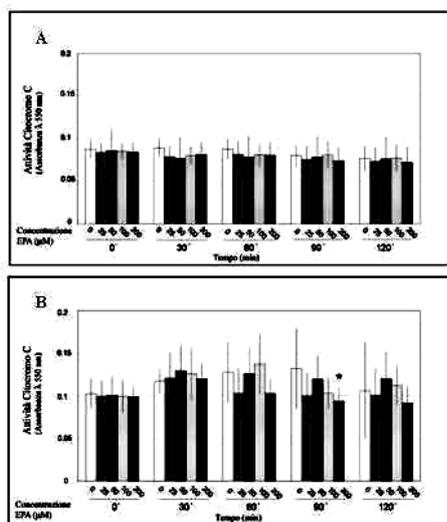


Fig. 1. Effetto dell'EPA sulla produzione di ROS da parte di neutrofili caprini non stimolati o stimolati con PMA.

La misurazione della produzione di ROS è stata effettuata mediante saggio della Riduzione del Citocromo c. I neutrofili sono stati isolati da sei capre ed esposti a concentrazioni crescenti di EPA in presenza di Citocromo c e l'assorbanza è stata misurata ogni 30 min. I dati sono presentati come media SEM. Sono stati usati 2×10^5 PMN non stimolati (A) e stimolati con PMA (B). L'analisi statistica è stata realizzata confrontando le diverse concentrazioni di EPA con il controllo negativo (in bianco in figura). La significatività è stata accettata per $P < 0.01$ (**) e $P < 0.05$ (*)

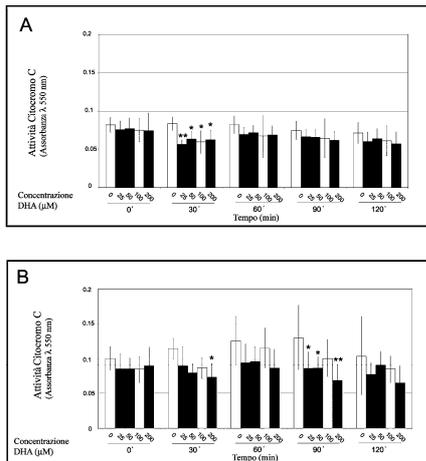


Fig. 2. Effetto dell’DHA sulla produzione di ROS da parte di neutrofili caprini non stimolati o stimolati con PMA.

La misurazione della produzione di ROS è stata effettuata mediante saggio della Riduzione del Citocromo c. I neutrofili sono stati isolati da sei capre ed esposti a concentrazioni crescenti di DHA in presenza di Citocromo c e l’assorbanza è stata misurata ogni 30 min. I dati sono presentati come media SEM. Sono stati usati 2×10^5 PMN non stimolati (A) e stimolati con PMA (B). L’analisi statistica è stata realizzata confrontando le diverse concentrazioni di DHA con il controllo negativo (in bianco in figura). La significatività è stata accettata per $P < 0.01$ (**) e $P < 0.05$ (*)

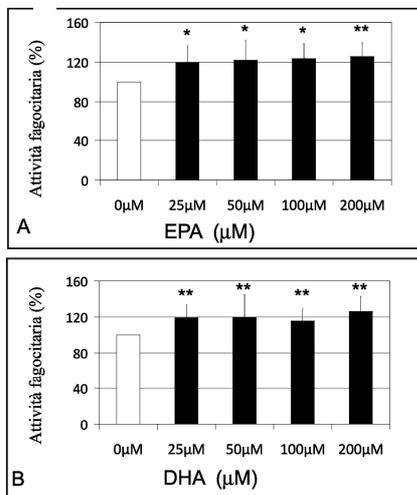


Fig. 3. Effetto di EPA e DHA sulla fagocitosi di neutrofili di capra.

I neutrofili isolati da sei capre sane sono stati incubati con crescenti concentrazioni di EPA (A) e DHA (B). Dopo 180 min sono stati aggiunti E. coli marcati con fluoresceina, e la quantità di batteri internalizzati è stata valutata misurando la fluorescenza dopo 120 min. I valori sono espressi come confronto fra percentuale di neutrofili incubati con EPA/DHA e controllo negativo (bianco in istogramma – neutrofili incubati con E. coli senza aggiunta di acidi grassi). La significatività è stata accettata per $P < 0.01$ (**) e $P < 0.05$ (*)

IN VITRO MODULATORY EFFECT OF Ω -3 POLYUNSATURATED FATTY ACID (EPA AND DHA) ON PHAGOCYTOSIS AND REACTIVE OXYGEN SPECIES (ROS) PRODUCTION OF GOAT NEUTROPHILS

An *in vitro* study was carried out to examine the influence of two fish-oil-derived long chain ω -3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs), eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), on goat polymorphonuclear leukocytes (PMN). Neutrophils were isolated from blood and incubated with increasing concentration of EPA and DHA (25, 50, 100, 200 mM). Control samples were incubated in the absence of ω -3 PUFAs.

Phagocytic activity was significantly increased by EPA ($P < 0.05$) and DHA ($P < 0.01$).

Treating PMN with EPA does not affect extracellular ROS production which is, on the contrary, down-regulated by DHA. This effect was increased in experimental conditions which mimic pro-inflammatory challenges (stimulation with PMA). This study demonstrates that EPA and DHA may have beneficial effect on goat neutrophil functions by increasing their phagocytosis activity and, in the meanwhile, decreasing the tissue damages due to extracellular release of ROS.

Key words: neutrophils, PUFAs, phagocytosis, ROS, goat.

UN CASO DI NEFROTOSSICOSI ASSOCIATA AD INTOSSICAZIONE ALIMENTARE DA MELAMINA

Vascellari Marta, Cocchi Monia, Gallina Albino, Agnoletti Fabrizio, Angeletti Roberto, Mutinelli Franco

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

Nel periodo novembre-dicembre 2008, due cani (un Maltese maschio di 3 anni e un Lhasa Apso maschio di un anno), provenienti da uno stesso allevamento di cani da esposizione in provincia di Treviso, sono deceduti con sintomatologia clinica ed analisi ematobiochimiche riferibili ad insufficienza renale.

L'esame anatomopatologico ha evidenziato abbondanti depositi di uroliti in sede renale e nel lume del bacinetto, bilateralmente; la parete della vescica urinaria si presentava ispessita. Era presente inoltre gastroenterite erosivo-emorragica e gengivite ulcerativa. L'esame istopatologico ha evidenziato diffusa presenza di cristalli in sede tubulare, sia nella zona midollare sia corticale e nel lume del bacinetto renale. In funzione dei risultati delle colorazioni istochimiche Oil Red O e Von Kossa, la maggior parte dei cristalli era riferibile a depositi di melamina e, in misura minore, di ossalato di calcio.

E' stata emessa diagnosi di nefrosi da cristalli, imputabile ad intossicazione da melamina. In diagnosi differenziale sono stati considerati avvelenamento da glicole etilenico, micotossicosi, avvelenamento da pesticidi fosforati e clorurati.

Le analisi di laboratorio effettuate su due campioni di mangime, somministrato ai soggetti fino al momento del decesso, hanno evidenziato la presenza di melamina in entrambi i campioni con valori rispettivamente di 766,8 ppm e di 158,5 ppm. Le analisi per ricerca di aflatoossina B1, ocratossina A, pesticidi clorurati e fosforati hanno dato esito negativo in entrambi i mangimi. L'ipotesi di avvelenamento da glicole etilenico è stata esclusa sulla base dell'assenza di detta sostanza nei locali dell'allevamento. Le indagini eseguite su campioni di rene di un soggetto e di urina di entrambi i soggetti hanno evidenziato la presenza di melamina.

Il percorso diagnostico attuato porta a ritenere che i soggetti siano deceduti in seguito ad un quadro di nefrotossicosi conseguente ad intossicazione da melamina di origine alimentare.

Parole chiave: cane, melamina, mangime nefrotossicosi, uroliti

CANINE NEPHROTOXICOSIS INDUCED BY MELAMINE-CONTAMINATED PET FOOD IN ITALY

Two young dogs belonging to the same kennel placed nearby Treviso (north-eastern Italy) died at the end of 2008 with clinical signs of renal failure. They were subjected to necropsy and were evaluated for histopathological and toxicological changes. Both the animals had same clinical signs and laboratory evidence of uremia. At necropsy bilateral yellowish discolouration of the inner part of the medulla with deposit of green yellowish uroliths in the medulla and renal pelvis was detected. No gross lesions were observed in the ureters, while diffuse thickening of the urinary bladder wall was evident. Ulceration of the oral mucosa, haemorrhagic gastritis and enteritis were also present. By histopathological examination, numerous, pale green-brown in colour, round shaped crystals, with radiating striations were evenly distributed throughout the cortex and medulla within renal tubules and collecting ducts. In both cases the Oil Red O stain demonstrated variable degrees of positive staining of the pale brown, rough-textured crystals indicating a plastic or lipid origin. High doses of melamine were detected in the pet food administered to the dogs, likewise melamine was identified in renal tissue from one dead dog and in urine samples from both the animals. Therefore, a diagnosis of melamine-related nephrotoxicosis was made.

Key words: dog, melamine, nephrotoxicosis, pet food, urolith

RUOLO DI HER-2 NELLA PROGnosi DEI TUMORI MAMMARI DELLA CAGNA

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

¹*Dipartimento di Patologia Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria - Università di Pisa. Viale delle Piagge, 2 I-56124 Pisa.* ²*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia. Via G. Marinuzzi, 3 I-90129 Palermo*

Il proto-oncogene HER-2 (c-erbB2/neu) codifica per recettore trans-membrana con attività tirosin-chinasica, correlato con fattore di crescita epiteliale (EGF) che si ritiene possa giocare un ruolo importante nella cancerogenesi delle neoplasie mammarie dell'uomo e degli animali. Gli autori riportano un'indagine sull'espressione di HER-2 nei tumori mammarie di cane, mediante una metodica immunisto chimica normalmente applicata e validata in medicina umana (Herceptest, Dako) e di un test analogo sviluppato impiegando lo stesso anticorpo primario policlonale ed un diverso sistema di rivelazione. Sono state analizzate 35 neoplasie mammarie di cane (11 adenomi e 24 carcinomi). L'espressione di HER-2 è stata valutata mediante lo scoring validato per l'Herceptest®. Inoltre l'espressione del recettore è stata correlata con il tempo di sopravvivenza, oltre che con il tipo istologico, il grading, l'invasione linfatica e l'indice mitotico. L'iperespressione di HER-2 è stata identificata in 3/11 tumori benigni ed in 4/24 neoplasie maligne (17%). Sorprendentemente anche una parte dei tessuti non neoplastici posti alla periferia delle neoplasie (3/15 adenosi e 1/6 iperplasie duttali) sono risultati over-esprimenti per HER-2. In conclusione, nella specie canina, l'iperespressione del recettore non sembra individuare un sottogruppo di tumori caratterizzato da maggiore aggressività e quindi una peggiore prognosi.

Parole chiave: tumore mammario, recettore HER-2, immunisto chimica, prognosi

CORRELATION BETWEEN HER-2 OVER-EXPRESSION AND SURVIVAL TIMES IN CANINE MAMMARY TUMORS

Proto-oncogene HER-2 encodes a transmembrane receptor protein with tyrosine-kinase activity. Previous studies have shown that HER-2 overexpression is present in the canine tumours, however, possible analogies between protein expression in canine and human species and correlation of HER-2 with the prognosis are still controversial. Twenty four canine mammary carcinomas, 11 mammary adenomas, and healthy and hyperplastic tissues were evaluated by immunohistochemistry (IHC) for HER-2 expression. Sections from four HER-2 over expressing human mammary carcinomas were included in the study. IHC was performed with Herceptest® Dako and by using the same primary antibody and a different detection system. HER-2 expression was evaluated according to the Herceptest scoring guidelines. HER-2 protein expression was also correlated to histological profile, grading, mitotic index, lymphatic invasion, and overall survival. HER-2 overexpression was detected in 3 out of 11 adenomas and 4 out of 24 carcinomas. IHC showed positivity not only, as expected in malignant tumors (17%), but surprisingly also in non neoplastic samples surrounding the neoplastic lesions (3/15 adenosis and 1/6 ductal hyperplasia). In contrast with human breast cancer HER-2 overexpression in the canine species does not seem to identify a subgroup of tumours with a poor prognosis.

Key words: mammary tumors, HER-2 receptor, immunohistochemistry, prognosis

LA DIFFERENZIAZIONE CELLULARE NEL TUMORE MAMMARIO DEL CANE: STUDIO IMMUNOISTOCHEMICO SU 18 TUMORI MALIGNI PLEOMORFI

Rasotto Roberta, Zappulli Valentina, Castagnaro Massimo

Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria, Università degli Studi di Padova, Viale dell'Università 16, 35020 Legnaro, PD

Nel presente lavoro è stato analizzato un gruppo di 18 tumori mammari canini maligni caratterizzati dalla presenza di una popolazione cellulare pleomorfa estesa nel compartimento basale/stromale e associata in 17 casi a una componente epiteliale luminale organizzata in tubuli e nidi. L'aspetto pleomorfo della popolazione basale/stromale ha suggerito uno studio immunohistochimico (IHC) a fini classificativi, che ha considerato in particolare i principali marcatori della differenziazione cellulare quali panCK, CK5, CK8_18, CK14, calponina (calp), alfa-actina della muscolatura liscia (sma) e vimentina (vim). L'indagine IHC ha permesso di identificare un caso di sarcoma (vim+), uno di carcinoma "pleomorfo" (CK8/18+) e due carcinosarcomi (CK8_18+ e vim+). Nei casi rimanenti (14), la popolazione pleomorfa ha presentato variabile espressione di panCK, CK5, CK14, vim, calp e sma; nel 50% dei casi (7/14) è risultata positiva a tutti i marcatori, mentre in un solo caso (1/14) ha manifestato unicamente positività alla CK5. In tutti i casi (14/14) la componente epiteliale luminale è risultata CK8_18+. I risultati hanno permesso di confermare in 16 casi la presenza di una doppia popolazione cellulare maligna. Le ipotesi circa l'origine di tali popolazioni sono discusse.

Parole chiave: tumore mammario, cane, differenziazione cellulare

CELL DIFFERENTIATION IN CANINE MAMMARY TUMOURS: IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY ON 18 PLEOMORPHIC MALIGNANT TUMOURS

In this work we studied 18 malignant canine mammary tumours characterized by a pleomorphic basal/stromal cell population, that was associated in 17 of these cases with a luminal epithelial cell component organized in tubules and nests. The pleomorphism of the basal/stromal population suggested an immunohistochemical analysis to classify the tumours. Particularly, some of the most used markers of cell differentiation were applied (panCK, CK5, CK8_18, CK14, calponina - calp, alpha-smooth muscle actin - sma e vimentina - vim). IHC analyses allowed identification of one sarcoma (vim+), one "pleomorphic" carcinoma (CK8_18+) and two carcinosarcomas (CK8_18+ and vim+). In the remaining cases (14) the pleomorphic population showed variable expression of panCK, CK5, CK14, vim, calp and sma; in 50% of these cases it was positive to all markers while only in one case it was exclusively CK5+. In all cases (14/14) the luminal epithelial component was CK8/18+. These results confirmed in 16 cases the presence of two different malignant populations. Hypotheses concerning the origin of these populations are discussed.

Key words: mammary tumour, dog, cell differentiation

MODELLO FELINO PER LO STUDIO DELLE LESIONI MAMMARIE PRE-INVASIVE ER/PR NEGATIVE DELLA DONNA

Burrai Giovanni P.^{1,2}, Miller Margaret A.², Marras Vincenzo³, Pirino Salvatore¹, Cabras Francesca L., Anfossi Antonio G.¹, Leoni Antonio¹, Addis Maria F.⁶, Mohammed Sulma I.^{3,4,5}, Antuofermo Elisabetta¹

*1*Department of Pathology and Veterinary Clinic, Sassari University, Italy. *2*Department of Comparative Pathobiology, Purdue University, West Lafayette, IN 47907, USA. *3*Institute of Anatomy and Histopathology, Sassari University, Sardinia, Italy. *4*Purdue Cancer Center, Purdue University, West Lafayette, IN 47907, USA. *5*Bindley Bioscience, Discovery Park, Purdue University, West Lafayette, IN 47907, USA. *6*PortoConteRicerche Srl, Tramarglio, Alghero (Sassari)

Il cancro alla mammella è la forma neoplastica più comunemente diagnosticata nella donna rappresentando la seconda causa di morte nella stessa. Le campagne di screening mammografico hanno consentito di rilevare, con sempre maggiore frequenza, le lesioni intraepiteliali (IELs) quali l'iperplasia tipica (UH) ed atipica (ADH) ed il carcinoma duttale *in situ* (DCIS), riconosciute fattori di rischio per l'insorgenza del carcinoma mammario invasivo nella donna. Scopo del nostro studio è stato quello di indagare la prevalenza, l'espressione di ER- α , progesterone, HER-2 *neu* e Ki67 delle IELs, in tessuti mammari felini. Sono state individuate 63 IELs in 57/203 gatte esaminate e classificate come: 17 UH (27%), 29 ADH (29%) e 44 DCIS (44%). Il recettore per l'ER era espresso nel 62,5% dei casi di UH e nel 2% di ADH, mentre tutti i DCIS e il 94% dei 44 tumori erano negativi. L'immunoreattività al PR è stata osservata nel 6% dei casi di UH, nel 7% di ADH e nel 17% dei DCIS basso grado, mentre i DCIS di intermedio e di alto grado ed i tumori non mostravano positività al recettore. L'immunoreattività al Ki67 presentava maggiore espressione nel DCIS alto grado. L'antigene HER-2 *neu* è risultato over-espresso nel 25% dei casi di UH, nel 27% di ADH, nel 32% dei DCIS, in 12 neoplasie (27%) e, inaspettatamente, nella mammella non neoplastica. I risultati osservati indicano che le gatte sviluppano IELs spontaneamente, con alta prevalenza e mostrano caratteristiche morfologiche simili alle lesioni preinvasive mammarie della donna. La perdita dell'espressione all'ER e PR nella maggior parte delle IELs atipiche e nei carcinomi individua nella specie felina un modello per lo studio della patologia preneoplastica ER e PR negativa nella donna.

Parole chiave: modello animale, lesioni intraepiteliali, lesioni ER-PR negative, gatto

FELINE MODEL FOR HUMAN ER/PR NEGATIVE PRE-INVASIVE BREAST DISEASE

Breast cancer is the second leading cause of death in women. Routine mammography has resulted in increased detection of intraepithelial lesions (IELs) as usual hyperplasia (UH), atypical ductal hyperplasia (ADH) and ductal carcinoma *in situ* (DCIS). Aim of our study was to investigate the prevalence, the IHC expression of ER- α , progesterone, HER-2 *neu*, and Ki67 of IELs in feline mastectomy specimens. Sixty-three mammary IELs were detected in mastectomy specimens from 57 (28%) of the 203 female cats. Lesions were classified as UH (27%), ADH (29%) and DCIS (44%). ER receptor was expressed in 62.5% of UH and in 2% of ADH, whereas all DCIS and 94% of 44 tumors were negative. PR positivity was observed in 6% of UH, in 7% of ADH, and in 17% of low-grade DCIS, whereas intermediate-grade or high-grade DCIS and all tumors were negative. Immunoreactivity for Ki67 was correlated with the degree of IELs with the strongest expression in DCIS high-grade. The antigen HER-2 *neu* was over-expressed in 4 UH (25%), 4 ADH (27%), 9 DCIS (32%), 12 tumors (27%) and, unexpectedly, in non-lesional mammary gland. In summary, female cats develop IELs spontaneously, with high prevalence, and share the full spectrum of morphologic features seen in human preinvasive breast lesions. Moreover the loss of ER and PR expression in most feline atypical IELs and carcinomas supports cats as a model for human ER and PR negative pre-invasive breast disease.

Key words: animal model, intraepithelial lesions; ER-PR negative breast disease, feline

ATTIVAZIONE E CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DELL'ONCOGENE AKT NEI TUMORI MAMMARI FELINI

**Maniscalco Lorella, De Maria Raffaella, Iussich Selina, Minelli Carla, Olivero Martina,
Sasaki Nobuo, Biolatti Bartolomeo**

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

AKT è una serina treonina chinasi attivata ed amplificata in alcuni tumori umani. L'attivazione di AKT avviene mediante fosforilazione e, nel tumore al seno della donna, induce chemioresistenza. In questo tumore l'attivazione di AKT è mediata principalmente da EGFR1,HER2/neu e dai recettori per gli estrogeni (ER α) ed è regolata dalla fosfatasi PTEN. Scopo di questo lavoro è quello di valutare l'attivazione di AKT (p-AKT) nelle neoplasie mammarie feline, di sequenziare il gene codificante per AKT felino (f-AKT) e studiare l'espressione proteica di AKT, p-AKT, HER2 e PTEN in linee cellulari derivate da FMC (carcinoma mammario felino)

Mediante tecnica immunoistochimica è stata valutata la positività a p-AKT su 80 FMC, 20 lesioni benigne, 3 metastasi e 2 ghiandole mammarie normali. Mediante Western Blot è stata analizzata l'espressione proteica di HER2, PTEN e AKT su 5 linee cellulari di FMC. È stato inoltre sequenziato automaticamente il prodotto dell'RT-PCR corrispondente ad f-AKT.

Il 75% dei carcinoma tubulopapillari è risultato positivo a p-AKT mediante tecnica immunoistochimica. Le linee cellulari di FMC mostrano attivazione di AKT in relazione all'overespressione di HER2 e a riduzione di PTEN. È stato inoltre sequenziato cDNA dall'esone 10 all'esone 13 rivelando un'omologia del 98% con uomo e cane.

Questi dati preliminari dimostrano che l'attivazione di AKT è correlata ad un comportamento biologico maligno delle cellule tumorali. Tali risultati confermano che AKT, come nell'uomo, partecipa alla patogenesi del carcinoma mammario confermando l'importanza di questo tumore in oncologia comparata

Parole chiave: carcinoma mammario felino, AKT, oncogeni

MOLECULAR CHARACTERIZATION AND ACTIVATION OF AKT ONCOGENE IN FELINE MAMMARY TUMORS

AKT is a serine/threonine kinase which results activated and amplified in several human tumors. Activation of AKT (by phosphorylation) is associated to chemoresistance in human breast cancer. In this tumor activation of Akt is mediated mainly by EGFR1,HER2/neu and estrogen receptor alpha (ER α) and is regulated by the phosphatase PTEN. Aim of this study is to evaluate the activation of feline AKT (f-AKT) in feline mammary tumors (FMC), to characterize the sequence of feline f-AKT gene and to study the proteic expression of AKT, p-AKT, HER2 and PTEN in FMC cell lines.

Activation of AKT protein was evaluated by immunohistochemistry on 80 FMC, 20 benign lesions, 3 metastasis and 2 normal mammary gland. Western blot anti HER2, PTEN and AKT was performed on 5 FMC cell lines. Products of RT-PCR corresponding to f-AKT were automatically sequenced.

Positivity to p-AKT was found in the 75% of tubulopapillary carcinoma. Western blot analysis revealed that all FMC cells lines showed activation of AKT in connection with HER2 overexpression and PTEN reduction. f-AKT cDNA was sequenced from exon 10 to 13 and revealed a homology of 98% with canine and human AKT sequences.

These preliminary data showed that activation of AKT is correlated to malignant behaviour of tumoral cells. These data showed that f-AKT plays, as in human, an important role in the pathogenesis of FMC confirming it as a suitable natural model in comparative oncology.

Key words: Feline mammary carcinoma, AKT, oncogene

INDICATORI ISTOPATOLOGICI DI PROGNOSI NEL MASTOCITOMA CUTANEO E VISCERALE DEL GATTO

Sabattini Silvia, Bettini Giuliano

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

I mastocitomi (MCT) sono frequenti tumori del gatto (9%), che insorgono prevalentemente a carico di cute, intestino e milza. Da un punto di vista istologico sono classificati in mastocitici (ben differenziati o pleomorfi) e istiocitici/atipici. Il comportamento biologico varia da benigno a maligno, ma i fattori di prognosi non sono ben definiti.

È stato condotto uno studio retrospettivo su 48 MCT di gatto, determinandone grado di differenziazione e pattern di crescita e quantificando infiltrazione di eosinofili, aggregati linfoidi, eritrofagocitosi e degenerazione del collagene. Mediante immunistochemica (IIC) sono stati inoltre valutati KIT (CD117) pattern, attività proliferativa (MIB-1/Ki67-index) e attività telomerasica (TERT-index). Sono state infine ottenute informazioni sul decorso clinico mediante interviste telefoniche.

Le determinazioni sono state effettuate su 36 MCT cutanei (18 ben differenziati, 10 pleomorfi e 8 atipici), 7 splenici (5 ben differenziati e 2 atipici) e 5 intestinali (1 pleomorfo e 4 atipici). Attività proliferativa e infiltrato infiammatorio sono risultati significativamente più elevati nei MCT pleomorfi e atipici. L'IIC ha rivelato una delocalizzazione dell'espressione di CD117 (citoplasmatica, a spot paranucleari o diffusa) in 42/46 casi (91%), mentre 17/33 campioni (52%) sono risultati positivi per TERT. I dati relativi alla sopravvivenza sono stati ottenuti in 26/48 casi; 6 gatti sono morti a causa del tumore (4 cutanei e 2 intestinali). Ki67-index e pleomorfismo cellulare si sono dimostrati negativamente correlati alla sopravvivenza.

I risultati indicano che la morfologia cellulare e l'espressione IIC di Ki67 possono offrire un valido aiuto per individuare i casi di MCT felino più aggressivi. La localizzazione aberrante di KIT e la presenza di attività telomerasica in un'elevata percentuale di casi suggeriscono il potenziale uso di tali molecole come target terapeutici.

Parole chiave: mastocitoma, gatto, KIT, telomerasi, prognosi

INTRODUZIONE

Il mastocitoma (MCT) nel gatto ha una prevalenza stimata tra l'1 e il 9% di tutti i tumori e può insorgere in tre principali forme anatomiche: cutanea, splenica/linforeticolare e intestinale/alimentare.

Limitatamente alle forme cutanee, il MCT viene classificato da un punto di vista istologico come mastocitico *ben differenziato*, mastocitico *pleomorfo*/scarsamente differenziato e *atipico*/istiocitico, mentre la caratterizzazione istopatologica delle forme viscerali non è stata oggetto di studi altrettanto approfonditi.

Il comportamento biologico del MCT felino è controverso e non facilmente prevedibile sulla base dei caratteri macroscopici o istologici. È opinione di molti autori che i MCT cutanei abbiano un andamento tendenzialmente benigno, mentre i MCT viscerali debbano essere considerate forme indipendenti, caratterizzate da comportamento più aggressivo e precoce diffusione metastatica; esiste tuttavia una sottopopolazione di gatti che sviluppa contemporaneamente MCT viscerali e cutanei, spesso senza un evidente sito primario di insorgenza. Il *grading* istologico proposto da Patnaik per il MCT del cane non è inoltre applicabile nel gatto, dove, ad oggi, non sono stati individuati parametri istopatologici prognosticamente predittivi ad esclusione dell'indice mitotico.

Da queste considerazioni è nata un'indagine retrospettiva su una casistica di MCT felini cutanei e viscerali, che sono stati caratterizzati da un punto di vista istologico (differenziazione cellulare, pattern di crescita, densità di granuli citoplasmatici, infiltrazione di granulociti eosinofili, presenza di aggregati linfocitari, eritrofagocitosi, degenerazione del collagene) e immunostochimico (espressione e citolocalizzazione della proteina KIT, attività telomerasica, attività proliferativa), sulla base di indicazioni derivate da precedenti studi condotti nel gatto e nel cane, allo scopo di individuare i parametri di maggiore utilità prognostica.

MATERIALI E METODI

È stato raccolto materiale di archivio relativo ai casi di mastocitoma felino pervenuti in un periodo di tempo di 20 anni (1988-2008) al servizio diagnostico di Anatomia Patologica della Facoltà di Medicina Veterinaria di Bologna. I campioni, fissati in *formalina* e inclusi in *paraffina*,

sezionati a 4 µm di spessore e colorati con EE, sono stati sottoposti a una nuova osservazione istologica per la conferma della diagnosi e la selezione delle sezioni più rappresentative.

Ciascun campione selezionato è stato classificato sulla base della morfologia cellulare come tipico, pleomorfo e atipico, secondo i criteri descritti (Tab.1). Nuove sezioni sono state colorate con *eosina* (secondo la tecnica di Dominici, per una migliore evidenziazione di eritrociti e granulociti eosinofili) e *blu di toluidina*.

L'immunostochimica (IIC) è stata applicata su tutti i campioni per la valutazione di KIT pattern (CD117), attività telomerasica (hTERT) e attività proliferativa (MIB-1). Pannello anticorpale e diluizioni d'uso sono riportati nella Tab. 1. Sono stati utilizzati appropriati controlli positivi allo scopo di valutare la specificità delle reazioni e accertare l'adeguata cross-reattività nei tessuti di gatto.

Tutti i parametri presi in considerazione e i sistemi di valutazione utilizzati in questo studio sono riassunti nella Tab. 1.

I risultati sono stati messi in relazione al decorso clinico dei casi (ottenuto mediante interviste telefoniche), per una migliore caratterizzazione del comportamento biologico del tumore e la ricerca di fattori prognostici.

RISULTATI

Istologia. Lo studio è stato effettuato su 36 MCT cutanei (18 ben differenziati, 10 pleomorfi e 8 atipici), 7 splenici (5 ben differenziati e 2 atipici) e 5 intestinali (1 pleomorfo e 4 atipici). Nel complesso si è potuta osservare una maggiore densità di granuli citoplasmatici nei MCT ben differenziati ($P = 0.0001$), seppure con scarsa reazione metacromatica al blu di toluidina anche nei casi più densamente granulari, e una maggiore infiltrazione di cellule infiammatorie (granulociti eosinofili e aggregati linfocitari) nei MCT pleomorfi e atipici (Tab. 2).

Immunostochimica. In 42/46 casi (91.30%) si è rilevata una positività per la *proteina KIT* con *pattern* di localizzazione aberrante, a *spot* paranucleari (KIT *pattern* II; $n = 18$; 39.13%) o citoplasmatico diffuso (KIT *pattern* III; $n = 24$; 52.17%) non in relazione all'istotipo (Figg. 1 e 2). In nessun caso è stata osservata una reattività esclusivamente di membrana, mentre 7 campioni sono risultati KIT-negativi. La *proteina TERT* è stata evidenziata nel 52% dei casi (17/33), con

localizzazione prevalentemente nucleare e rinforzo nucleolare, e una percentuale di cellule positive doppia nei MCT pleomorfi rispetto ai MCT ben differenziati (44.26% vs. 19.95%; $P = 0.0333$) (Figg. 3 e 4). L'attività proliferativa è risultata significativamente più elevata negli istotipi pleomorfo e atipico (Ki67-index medio: 23.31% e 16.02%) rispetto ai MCT ben differenziati (9.17%; $P = 0.0022$), con andamento non correlato all'attività telomerica (Tab. 2).

Sopravvivenza. I dati relativi alla sopravvivenza sono stati ottenuti in 26/48 casi (19 MCT cutanei, 4 splenici e 3 intestinali). Sei gatti sono deceduti a causa del tumore (4 con MCT cutaneo, 2 con MCT intestinale), 13 erano ancora in vita al termine del periodo di studio, mentre 7 pazienti sono deceduti per cause indipendenti dal tumore. In 4 casi è stata riferita l'insorgenza di recidiva locale (nessun decesso) e in 9 lo sviluppo di metastasi a distanza o il coinvolgimento sistemico cute/milza (6 decessi), in nessuna relazione con il pattern di crescita. L'istotipo pleomorfo si è dimostrato associato ad un esito sfavorevole (5 su 6 gatti deceduti, 1 su 13 dei gatti ancora in vita). Anche l'attività proliferativa è risultata inversamente correlata alla sopravvivenza, con un Ki67-index medio delle forme mortali (30.68%) significativamente maggiore di quelle non mortali (17.32%) ($P = 0.01$) e più elevato nei MCT recidivanti e metastatici (25.73%) rispetto ai MCT non recidivanti e non metastatici (12.36%).

DISCUSSIONE

Si è ipotizzato che il mastocitoma felino abbia un meccanismo patogenetico simile a quello del cane, ma sono pochi per ora gli studi pubblicati riguardo acquisizioni di funzione del proto-oncogene *c-kit* nel gatto e ad oggi non è stata riferita la presenza di *pattern* aberranti di espressione della proteina KIT, né la possibilità che tale delocalizzazione sia dovuta a mutazioni attivanti, analogamente a quanto avviene nel cane. In questo studio la proteina KIT è risultata espressa nel 91% dei casi, tutti con localizzazione aberrante, il che suggerisce l'opportunità di ulteriori ricerche per valutare la potenziale compresenza di mutazioni attivanti il proto-oncogene *c-kit* e le conseguenti implicazioni prognostiche.

È noto come i precursori dei mastociti acquisiscano nel corso del processo evolutivo un'induzione transitoria di attività telomerica mediata da fattori di crescita, per poi perderla definitivamente con la maturazione. Ricerche

effettuate su linee cellulari di MCT umano hanno rilevato livelli persistentemente elevati di attività telomerica nelle cellule neoplastiche, totalmente svincolata da fattori di crescita e inibitori del ciclo cellulare. Nel nostro studio l'evidenziazione IIC della subunità catalitica TERT ha fornito un'indicazione indiretta della presenza di telomerasi nel 52% dei campioni, con una grande variabilità di espressione da caso a caso, a suggerire che l'attivazione dell'enzima possa giocare un ruolo importante nella progressione di alcune forme di mastocitoma. Nei casi studiati non sono emerse correlazioni tra espressione di TERT e Ki67-index, a possibile supporto dell'ipotesi che l'attivazione della telomerasi abbia luogo indipendentemente dai segnali di proliferazione.

Diversi autori sono concordi nel considerare l'indice mitotico l'unico fattore prognostico nel MCT felino. In questo studio la percentuale di cellule in ciclo rilevata nei casi ad esito sfavorevole risulta effettivamente più elevata rispetto a quella dei tumori che non hanno determinato la morte dell'animale. Nel sistema di *grading* istologico secondo Patnaik, il grado di anaplasia appare estremamente attendibile ai fini prognostici e correlato ai tempi di sopravvivenza nel cane. Nel gatto una simile correlazione non è mai stata dimostrata; secondo i nostri dati tuttavia l'istotipo pleomorfo è significativamente correlato a un esito prognostico sfavorevole.

CONCLUSIONE

In questo studio il pleomorfismo nucleare e un'elevata frazione di crescita sono associati a una prognosi sfavorevole. Nell'attesa che i nostri risultati siano confermati da uno studio prospettico su popolazioni più numerose, riteniamo pertanto che la valutazione della morfologia cellulare e l'analisi IIC di Ki67 debbano essere affiancate alla semplice considerazione della sede anatomica del tumore nell'inviduare i casi di mastocitoma felino a comportamento più aggressivo.

Infine, l'evidenza di una delocalizzazione della proteina KIT e di attività telomerica in una significativa proporzione di casi mette in luce le potenzialità di approcci terapeutici che prevedano l'inibizione di queste vie.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Chaves-Dias C, Hundley TR, Gilfillan AM *et al.*: Induction of telomerase activity during

- [2] development of human mast cells from peripheral blood CD34+ cells: comparisons with tumor mast-cell lines. *J Immunol* 166:6647-6656, 2001.
- [3] Isotani M, Tamura K, Yagihara H *et al.*: Identification of a c-Kit exon 8 internal tandem duplication in a feline mast cell tumor case and its favorable response to the tyrosine kinase inhibitor imatinib mesylate. *Vet Immunol Immunopathol* 114:168-172, 2006.
- [4] Johnson TO, Schulman FY, Lipscomb TP *et al.*: Histopathology and biologic behavior of pleomorphic cutaneous mast cell tumors in fifteen cats. *Vet Pathol* 39:452-457, 2002.
- [5] Lepri E, Ricci G, Leonardi L *et al.*: Diagnostic and prognostic features of feline cutaneous mast cell tumours: a retrospective analysis of 40 cases. *Vet Res Comun* 27:707-709, 2003.
- [6] Litster AL, Sorenmo KU: Characterisation of signalment, clinical and survival characteristics of 41 cats with mast cell neoplasia. *J Feline Med Surg* 8:177-183, 2006.
- [7] Miller MA, Nelson SL, Turk JR *et al.*: Cutaneous neoplasia in 340 cats. *Vet Pathol* 28:389-395, 1991.
- [8] Molander-McCrary H, Henry CJ, Potter K *et al.*: Cutaneous mast cell tumors in cats: 32 cases (1991-1994). *J American Anim Hosp Assoc* 34:281-284, 1998.
- [9] Webster JD, Yuzbasiyan-Gurkan V, Miller RA *et al.*: Cellular proliferation in canine cutaneous mast cell tumors: associations with c-KIT and its role in prognostication. *Vet Pathol* 44:298-308, 2007.
- [10] Wilcock BP, Yager JA, Zink MC: The morphology and behavior of feline cutaneous mastocytomas. *Vet Pathol* 23:320-324, 1986.

<i>Parametri istologici</i>	<i>Colorazione</i>	<i>Sistema di valutazione</i>
Istotipo	EE	<i>Mastocitico ben differenziato</i> - cordoni di mastociti morfologicamente normali, di dimensioni regolari e a margini discreti; <i>Mastocitico scarsamente differenziato/pleomorfo</i> - marcate atipie nucleari, cariomegalia e presenza di cellule giganti multinucleate; <i>Atipico</i> - limiti cellulari mal definiti, cellule di forma da poligonale ad allungata con citoplasma abbondante, pallido, eosinofilo, spesso vacuolizzato e nuclei vescicolosi, talora indentati
Pattern di crescita	EE	<i>Compatto nodulare</i> - nodulo ben delimitato, non capsulato; <i>Compatto infiltrativo</i> - nodulo ben delimitato, ma con cellule neoplastiche raggruppate o isolate che si estendono nel tessuto limitrofo; <i>Diffuso</i> - infiltrazione non delimitata di mastociti neoplastici
Granuli citoplasmatici	Blu di toluidina	1 - citoplasma con bassa densità di granuli nella maggior parte dei mastociti; 2 - densità moderata nella maggior parte dei mastociti o densità elevata in meno della metà della popolazione cellulare; 3 - densità elevata di granuli nella maggior parte delle cellule neoplastiche
Eosinofili infiltranti	Eosina	0 - assenti; 1 - occasionalmente presenti; 2 - numero moderato di eosinofili isolate o gruppi di almeno 3 cellule; 3 - presenti in numero elevato
Aggregati linfocitari (*)	EE	0 - assenti; 1 - scarsamente presenti; 2 - presente in numero moderato; 3 - presenti in numero elevato
Degenerazione del collageno (*)	EE	Presente/Assente
Eritrofagocitosi	Eosina	Presente/Assente
<i>Parametri IIC</i>	<i>Pannello Ab</i>	<i>Sistema di valutazione</i>
<i>KIT pattern</i>	CD117 (1:100) policl. coniglio RA: 2 cicli in forno a microonde per 5 min	<i>KIT pattern I</i> - localizzazione prevalentemente di membrana, con colorazione citoplasmatica minima o assente; <i>KIT pattern II</i> - intensa localizzazione citoplasmatica focale, generalmente paranucleare; <i>KIT pattern III</i> - localizzazione citoplasmatica diffusa e intensa (Punteggio assegnato in base al pattern di colorazione più elevato rilevato in almeno 10% delle cellule neoplastiche o in ampi raggruppamenti di cellule)
Attività telomerasica	hTERT (1:50) monocl. topo RA: 2 cicli in forno a microonde per 5 min	<i>TERT-index</i> - percentuale media di cellule neoplastiche positivamente marcate valutata in 5 HPF (positività nucleare e nucleolare)
Attività proliferativa	MIB-1 (1:30) monocl. topo RA: 4 cicli in forno a microonde per 5 min	<i>Ki67-index</i> - percentuale media di cellule neoplastiche positivamente marcate valutata in 5 HPF (positività nucleare)

Tabella 1. Parametri istologici e immunoistochimici (IIC) considerati e sistema di valutazione adottato.

(*) Valutati solo nelle forme cutanee; RA = riesposizione antigenica.

Sede	Istotipo No. (% total)			Granuli No. (% total)			Eosinofili No. (%)			Aggregati linfocitari No. (%)				KIT No. (%)			hTERT- index medio (%)	Ki67- index medio (%)		
	WD	Pl	At	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	neg.	KP1			KP2	KP3
MCT cutanei	18/36 (50)	10/36 (27.78)	8/36 (22.22)	6/36 (16.67)	16/36 (44.44)	14/36 (38.89)	16/36 (44.44)	4/36 (11.11)	5/36 (13.89)	11/36 (30.56)	12/36 (33.33)	11/36 (30.56)	4/36 (11.11)	9/36 (25)	3/34 (8.82)	0/34 (0)	9/34 (26.47)	22/34 (64.71)	25.56	13.72
MCT splenici	5/7 (71.43)	0/7 (0)	2/7 (28.57)	2/7 (28.57)	2/7 (28.57)	3/7 (42.86)	5/7 (71.44)	1/7 (14.28)	0/7 (0)	1/7 (14.28)	N/A	N/A	N/A	N/A	1/7 (14.29)	0/7 (0)	5/7 (71.42)	1/7 (14.29)	0	12.82
MCT intestinali	0/5 (0)	1/5 (20)	4/5 (80)	5/5 (100)	0/5 (0)	0/5 (0)	1/5 (20)	1/5 (20)	1/5 (20)	2/5 (40)	N/A	N/A	N/A	N/A	0/5 (0)	0/5 (0)	4/5 (80)	1/5 (20)	32.52	26.53
Totale	23/48 (47.92)	11/48 (22.92)	14/48 (29.16)	13/48 (27.08)	18/48 (37.50)	17/48 (35.42)	22/48 (45.83)	6/48 (12.50)	6/48 (12.50)	14/48 (29.17)					4/46 (8.70)	0/46 (0)	18/46 (39.13)	24/46 (52.17)	22.88	14.41

Tabella 2. Risultati delle valutazioni istopatologiche e immunistochemiche effettuate su 48 MCT di gatto raggruppati in base alla sede anatomica.

BD = ben differenziato; Pl = pleomorfo; At = atipico; N/A = non applicato; KP = KIT *pattern*.

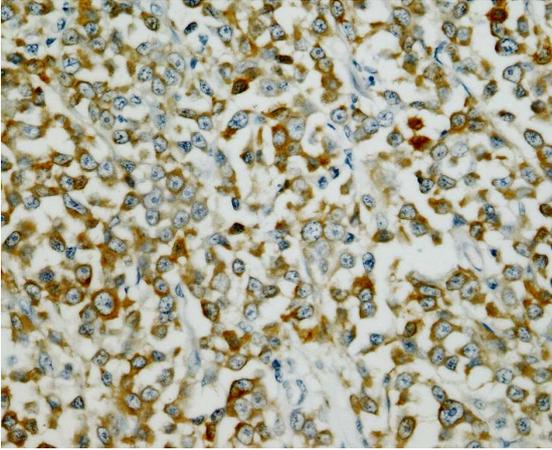


Figura 1. MCT atipico/istiocitico. Valutazione immunohistochimica dell'espressione della proteina KIT. Positività citoplasmatica a spot paranucleari (*KIT pattern II*). CD117.

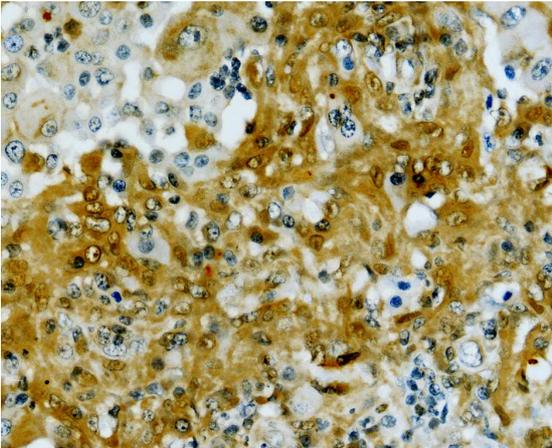


Figura 2. MCT pleomorfo. Valutazione immunohistochimica dell'espressione della proteina KIT. Intensa e diffusa positività citoplasmatica (*KIT pattern III*). CD117.

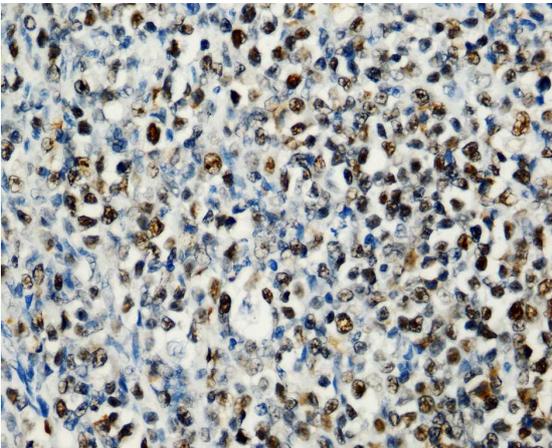


Figura 3. MCT atipico. Valutazione indiretta dell'attività telomerasica mediante ricerca immunohistochimica della proteina TERT. Intensa positività nucleare in una elevata percentuale di cellule neoplastiche con rinforzo nucleolare. hTERT.

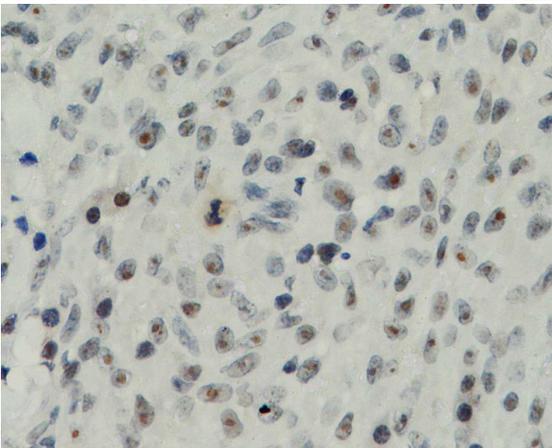


Figura 4. MCT atipico. Valutazione indiretta dell'attività telomerasica mediante ricerca immunohistochimica della proteina TERT. Positività quasi esclusivamente nucleolare in una elevata percentuale di cellule neoplastiche. hTERT.

HISTOPATHOLOGICAL PROGNOSTICATORS IN FELINE CUTANEOUS AND VISCERAL MAST CELL TUMORS

Cell differentiation, growth pattern, infiltrating eosinophils, lymphoid aggregates, erythrophagocytosis and collagen degeneration were evaluated retrospectively in 48 feline MCTs. Immunohistochemistry (IHC) was also applied to assess KIT (CD117) pattern, cell proliferation (MIB-1/Ki67-index) and telomerase activity (TERT-index). Follow-up information was obtained via telephone interviews.

Histological analyses were performed on 36 cutaneous MCTs (18 well-differentiated, 10 pleomorphic and 8 atypical), 7 splenic (5 well-differentiated and 2 atypical) and 5 intestinal (1 pleomorphic and 4 atypical). Proliferative activity and inflammatory infiltrates were significantly higher in pleomorphic and atypical MCTs. IHC revealed cytoplasmic expression of CD117, either focally clustered or diffuse, in 42/46 cases (91%), and TERT was expressed in 17/33 samples (52%). Survival data were achieved in 26/48 cases; 6 cats died of tumor-related causes (4 cutaneous and 2 intestinal). Ki67-index and pleomorphism were negatively related to survival.

These findings suggest that cell morphology and Ki67 IHC may be of help to decide which cases of feline MCT are to be considered more at risk. Aberrant KIT localization and presence of telomerase activity advise exploration of these pathways as potential therapeutic targets.

Key words: mast cell tumor, feline, KIT, telomerase, prognosis

OVER-ESPRESSIONE DELLA CATENA PESANTE DELLA FERRITINA NEI TUMORI DELLA VESCICA NEL BOVINO

Brun R., Russo V., Urraro C., Roperto S., Paciello O., Borzacchiello G., Roperto F.

Dip. Patologia e Sanità Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Napoli Federico II

La ferritina è la più importante proteina coinvolta nell'immagazzinamento del ferro. E' costituita da 24 subunità formate da catene pesanti(H) e catene leggere(L). L'aumento della espressione della catena pesante della ferritina (FHC) è frequentemente riscontrata in patologie infiammatorie, autoimmuni e neoplastiche. Lo scopo del nostro lavoro è stato di studiare l'espressione della catena pesante della ferritina (FHC) in 6 tumori papillari e in 4 tumori invasivi della vescica urinaria di bovini associati ad infezione con BPV-2. FHC è stata valutata tramite indagini di immunistochemica, western blot, RT-PCR , e Real-Time-PCR. I nostri risultati hanno dimostrato over-espressione di FHC nei tumori ed un aumento dei livelli sia della proteina che dell'RNA. Abbiamo inoltre evidenziato over-espressione di p65, un importante componente del fattore di trascrizione NF-kB. Si suppone che l'over-espressione di FHC, così come riportata in questo studio, sia dovuta alla attivazione di NF-kB/p65, pertanto riteniamo che l' upregulation di FHC è mediata da NF-kB e può essere una delle chiavi molecolari con cui le cellule uroteliali infette con BPV-2 sono protette dall'apoptosi.

Parole chiave: ferritina (FHC), p65, NF-kB, vescica urinaria, bovino

FERRITIN HEAVY CHAIN (FHC) IS UPREGULATED IN PAPILLOMAVIRUS-ASSOCIATED UROTHELIAL TUMOURS OF THE URINARY BLADDER IN CATTLE

Ferritin is the most important protein involved in iron storage. It is formed of 24 subunits consisting of heavy chains (H) and light chains (L). Increased expression of ferritin heavy chain (FHC) is frequently found in inflammatory diseases, autoimmune and neoplastic. The aim of our work was to study the expression of ferritin heavy chain (FHC) in 6 papillary tumors and in 4invasive tumors of the urinary bladder of cattle associated with infection with BPV-2. FHC was evaluated by immunohistochemistry, western blot, RT-PCR, and Real-Time-PCR methods. Our results showed an over-expression of FHC in tumors and increased levels of protein and RNA. We also highlighted an over-expression of p65, an important component of the transcription factor NF-kB. It is supposed that the over-expression of FHC reported in this study is due to activation of NF-kB/p65, therefore we believe that FHC upregulation is mediated by NF-kB and it may be one of the molecular keys whereby BPV-2-infected urothelial cells are protected from apoptosis or programmed cell death in cattle.

Key words: ferritin (FHC), p65, NF-kB, urinary bladder, cattle

APPLICAZIONE DELLA TECNICA ISTOLOGICA 3D NELLA VALUTAZIONE DEI MARGINI CHIRURGICI IMPIEGANDO IL SARCOMA INIEZIONE-INDOTTO FELINO (FIIS) COME MODELLO.

Grieco Valeria, Giudice Chiara, Fulvia Russo, Stefanello Damiano*, Romussi Stefano*, Cantatore Matteo, Di Giancamillo Mauro*

*Dipartimento di Patologia Animale. Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria. * Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie - Facoltà di Medicina Veterinaria – Università degli Studi di Milano*

La valutazione dei margini chirurgici si effettua con diverse tecniche di trimming. In medicina umana la tecnica più applicata è la 3D che vede l'esame del perimetro completo del campione, di una sezione completa dello stesso e dei piani marginali profondi. Il presente studio sperimenta la tecnica 3D sfruttando come modello il FIIS. Esso infatti è una neoplasia a carattere altamente infiltrante che sembra recidivare indipendentemente dallo stato dei margini chirurgici. Tuttavia non ci si è mai domandati con che tecnica di trimming si accertasse lo stato di tali margini, nè quante porzioni di essi venissero esaminate. Poiché lo stato dei margini chirurgici ha valore prognostico, è chiaro come il ruolo del patologo, cui spetta la valutazione di tali margini, risulti cruciale.

In questo studio sono stati esaminati 48 FIIS. In 32/48 casi i margini non erano infiltrati dalla neoplasia (NI) mentre in 16 tali margini risultavano infiltrati (I). La recidiva è stata osservata in 6/32 (19%) tumori con margini NI e in 11/16 tumori con margini I (69%). Dalle valutazioni statistiche è emerso che i tumori con margini I avevano una probabilità di recidivare 10 volte maggiore rispetto a quelli con margini NI ($P = 0.0011$). Nessuna correlazione statisticamente significativa era presente tra il grado del tumore e la recidiva.

L'esame dei margini effettuato con la tecnica 3D ha mostrato una buona predittività nei confronti di una eventuale recidiva dopo chirurgia. Non solo, con la valutazione dei margini mediante 3D si dimostra che solo il 19% dei FIIS con margini NI va incontro a recidiva, dato che combacia con lavori di medicina umana che impiegano la stessa tecnica. Le segnalazioni da cui emerge che il FIIS presenta rischio di recidiva più alto potrebbero forse dipendere dal fatto che, in quei casi, i margini definiti liberi da neoplasia non lo fossero realmente in quanto non esaminati nella loro totalità.

Concludendo, l'impiego della tecnica 3D nella valutazione dei margini chirurgici potrebbe favorire un standardizzazione delle tecniche di trimming, rendendo più facilmente confrontabili i dati ottenuti da diversi laboratori e permettendo studi congiunti su grandi quantità campioni e quindi di alto rilievo statistico.

Parole chiave: stato dei margini, 3D, FIIS

APPLICATION OF THE THREE DIMENSIONAL (3-D) HISTOLOGICAL TECHNIQUE IN THE EVALUATION OF THE SURGICAL MARGINS USING THE FELINE INJECTION-INDUCED SARCOMA AS A MODEL

The three-dimensional (3-D) histology technique that is used in human medicine for the evaluation of complete lateral and deep surgical margins, was applied to 48 excised feline injection-induced sarcoma specimens. The predictive value of the histological margin status and of tumour-grading on local recurrence was investigated. In 32/48 cases, the margins were not infiltrated (NI), and in the remaining 16 cases, they were infiltrated (I). Overall, 6/33 tumours with NI margins (18%) and 11/16 with I margins (69%) recurred. Tumours with I margins recurred about 10 times more frequently compared to tumours with NI margins ($P = 0.0011$). No statistically significant correlation was observed between grading and recurrence. The assessment of margin status by applying the 3-D histology technique showed a good predictivity for post-surgical tumour recurrence. Extensive application of the 3-D technique is recommended to obtain a standardisation of histological margin evaluation, thus permitting the comparison between results obtained in different laboratories.

Key words: margin status, 3D histology, FIIS

ANALISI DEL PATTERN DI ESPRESSIONE DI MICRORNA IN NEOPLASIE LINFOPROLIFERATIVE CANINE

Gelain Maria Elena, Gioia Gloria, Mortarino Michele, Comazzi Stefano

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

I MicroRNA (miRNA), una classe di piccoli RNA non-codificanti, rivestono un ruolo fondamentale nella regolazione della crescita e differenziazione tessutale, del ciclo cellulare e dell'apoptosi, attraverso un meccanismo di down-regolazione di specifici mRNA target e regolazione della sintesi proteica. Variazioni nei loro livelli d'espressione sono state quindi associate alla patogenesi di un'ampia varietà di tumori in medicina umana, a partire dalle leucemie linfocitiche croniche. Rari sono invece i lavori in medicina veterinaria dove si sono indagati i livelli d'espressione di miRNA, sia in tessuti sani sia patologici. Scopo di questo lavoro è valutare, mediante PCR quantitativa, i livelli di espressione dei principali miRNA coinvolti nei processi di maturazione e differenziazione delle cellule ematopoietiche, in differenti tipi di neoplasie linfoidi e in leucociti normali. Sono stati analizzati 15 casi di linfoma (7 linfomi T, 8 linfomi B) e 8 casi di leucemie linfocitiche croniche (3 leucemia T, 5 leucemie B). Il sangue periferico di 3 cani sani è stato usato per isolare, tramite cell-sorting, le principali sottopopolazioni leucocitarie. Otto miRNA (miR-15a, miR-16-1, miR-29b, miR-17-5p, miR150, miR-155, miR-181a, miR-223) sono stati analizzati tramite i corrispondenti Human MicroRNA TaqMan® Assays e normalizzati con il gene housekeeping miR-26b. Nel leucociti normali, miR-150, miR-155 e miR-29b sono maggiormente espressi nei linfociti, mentre miR223 e miR-15a nelle cellule d'origine mieloidi. I linfomi B hanno evidenziato livelli di espressione significativamente più alti per miR17-Sp, mentre miR-181 è maggiormente espresso nelle forme T. In queste ultime, è anche stata evidenziata una significativa downregolazione di miR-29b. Nelle leucemie linfocitiche croniche si è notata una tendenza alla sovra-espressione di miR-155 nelle forme B. Questi dati preliminari, pur se ottenuti su un numero limitato di casi, hanno evidenziato come siano presenti differenti pattern d'espressione di miRNA in leucociti normali e in differenti sottotipi di neoplasie linfoidi, suggerendo il loro coinvolgimento, anche nel cane, nella patogenesi delle neoplasie ematopoietiche.

Parole chiave: MicroRNA, linfoma, leucemia linfocitica cronica, cane

INTRODUZIONE

I microRNA, piccoli RNA non codificanti, giocano un ruolo fondamentale nella regolazione dei processi di differenziazione, maturazione e proliferazione cellulare¹. I microRNA maturi infatti si legano al terminale 3'-UTR di RNA messenger target, bloccandone la traduzione o inducendone la degradazione. In entrambi i casi, il risultato finale è una riduzione della proteina codificata dal mRNA. Per questo motivo, alla base di molti tumori in medicina umana, sono stati identificate variazioni dei livelli di espressione di numerosi Mirna². La prima dimostrazione di un coinvolgimento dei Mirna nell'oncogenesi si è avuta in oncoematologia, in particolare nella leucemie linfocitiche croniche (CLL) dove si è evidenziata una down-regolazione di Mir-15 e Mir-16 con conseguente aumento della proteina BCL-2, una delle loro proteine target ad attività anti-apoptotica e diminuzione dell'apoptosi dei linfociti neoplastici³. Molto scarsi sono invece i lavori in medicina veterinaria che hanno indagato il ruolo dei Mirna nei tumori⁴⁻⁵.

Scopo del nostro lavoro è stato quello di valutare i livelli di espressione dei principali Mirna coinvolti nei processi di regolazione e maturazione dei tessuti ematopoietici nel cane, sia in cellule normali sia in campioni di neoplasie linfoproliferative, per identificare l'eventuale presenza di profili d'espressione tipici delle singole sottopopolazioni leucocitarie e in neoplasie a diverso fenotipo e stadi maturativi, con lo scopo di valutarne l'utilità diagnostica, prognostica e per indagare ulteriormente la patogenesi di tali neoplasie.

MATERIALI E METODI

Sono stati considerati 8 Mirna la cui sequenza era depositata in banca dati (MirBase) o presente in letteratura⁶. L'identità di sequenza tra i Mirna canini maturi e i corrispettivi umani è stata confermata tramite allineamento BLAST. Sono stati presi in considerazione i principali mirna coinvolti nei processi di differenziazione e maturazione delle cellule ematopoietiche: miR-15 e miR-16-1 (regolazione dell'apoptosi), miR-17-5p (Sviluppo dei linfociti B da pre-B a pro-linfociti B e inibizione dell'apoptosi), miR-150 e miR-155 (modulazione della maturazione e della funzionalità linfocitarie) miR-29b e miR-181a (regolazione della proliferazione linfocitarie

tramite inibizione di oncogeni) e miR-223 (regolazione della maturazione granulocitaria).

Il sangue periferico di 3 cani clinicamente sani è stato utilizzato per l'isolamento delle principali sottopopolazioni linfocitarie tramite cell-sorting (CD4, CD8 e CD21), dei polimorfonucleati (PMN) isolati mediante centrifugazione in gradiente di densità e delle piastrine ottenute per centrifugazione del plasma.

Sono stati esaminati 23 casi di neoplasie linfoproliferative, tipizzate tramite esame citofluorimetrico. In particolare, sono stati esaminati 7 linfomi T (5 linfomi small clear cells e 2 pleomorfi misti), 8 casi di linfomi B centroblastici pleomorfi e 8 casi di leucemie linfocitiche croniche (3 T-cell, 5 B-cell).

L'RNA è stato estratto con kit di isolamento mirVanaTM (Ambion), retrotrascritto con TaqMan[®] MicroRNA Reverse Transcription Kit (ABI) e amplificato con Human MicroRNA TaqMan Assay kit (Applied Biosystems). La quantificazione assoluta di ogni Mirna è stata ottenuta interpolando i valori di Ct ottenuti con una curva di riferimento (*mirVanaTM miRNA Reference Panel v9.1*, Ambion). I valori di espressione relativa sono stati calcolati con il metodo del $\Delta\Delta Ct$ ⁷, utilizzando come campione di riferimento RNA estratto da sangue periferico e linfonodi normali. Come gene housekeeping per la normalizzazione è stato scelto il Mirna mir-26b, che si è rilevato il più stabile dopo analisi con geNorm e Normfinder. I dati relativi ai livelli di espressione nei linfomi è stata effettuata mediante test non parametrico Wilcoxon-Mann (SPSS, version 13, SPSS, Chicago, IL, USA). Il p-value inferiore a 0.05 è stato considerato significativo.

RISULTATI

L'analisi dell'espressione dei Mirna nelle sottopopolazioni isolate ha permesso di identificare la presenza di pattern caratteristici delle diverse linee cellulari e nelle diverse forme di neoplasie. I linfociti T, sia CD4 sia CD8, infatti hanno evidenziato una maggiore espressione di miR-150, mentre, così come nell'uomo, anche nel cane i granulociti sono caratterizzati da livelli superiori di miR-223 oltre che di miR-15. I Mirna maggiormente espressi nei linfociti B CD21+ sono risultati miR-29 e miR-150, anche se con livelli decisamente inferiori rispetto alle altre sottopopolazioni linfocitarie. L'analisi dei campioni patologici ha evidenziato come le CLL abbiano un'aumentata espressione di miR-29, miR-

150 e mir-155. In particolare, questo ultimo si è rilevato particolarmente over-espresso in 3 dei 5 casi di CLL-B. I casi di linfomi a cellule T (CD3+CD4+) erano caratterizzati da una down-regolazione del mir-29 e un'augmentata espressione di mir-181a, mentre i linfomi centroblastici a fenotipo CD21+CD79a+ hanno evidenziata una maggior espressione di mir-17-5p. Differenze statisticamente significative ($P < 0.05$) tra linfomi T e linfomi B si sono evidenziate per mir-29, mir-150 e mir-17-5p.

DISCUSSIONE

Il controllo dell'espressione proteica svolto dai microRNA è una delle più recenti acquisizioni in medicina umana ed ha aperto la strada a numerosi studi in oncologia⁸. Data loro capacità infatti di regolare negativamente la sintesi proteica, variazioni nei normali livelli di espressione possono essere alla base di molti tumori, tra i quali le neoplasie ematopoietiche. Mentre numerosi sono i lavori che hanno indagato il ruolo dei Mirna nella CLL e nei linfomi umani, molto limitati sono i report in oncologia veterinaria⁴⁻⁵. I nostri dati, pur se limitati dal numero relativamente esiguo di casi, hanno permesso di evidenziare come, anche nel cane così come già dimostrato nell'uomo⁹, siano presenti Mirna tipicamente espressi nelle cellule linfoidi (mir-150, mir-155), mentre altri sono tipici delle cellule mieloidi (mir-223). E' probabile quindi che svolgano anche nel cane le stesse funzioni, come la regolazione della maturazione dei linfociti B per quanto riguarda mir-150 e la differenziazione sia dei linfociti B sia T per mir-155². E' interessante notare come forme di neoplasie linfoidi diverse abbiano evidenziato quadri d'espressione diversi, non collegati alla linea cellulare coinvolta. Nei linfomi T infatti si è riscontrata una up-regolazione di mir-181a, normalmente presente con livelli d'espressione intermedi nei linfociti T. In medicina umana i mir-181 ha una duplice funzione di oncogene e oncosoppressore, probabilmente legate allo specifico contesto cellulare¹⁰, e insieme a mir-29b, è down-regolato nelle forme più aggressive di CLL dove si nota un aumento di una delle loro proteine bersaglio ad attività oncogena, Tc11¹¹. Anche nei linfomi B si è potuto notare un quadro sovrapponibile in tutti i casi esaminati, con caratteristica dominante un'augmentata espressione di mir-17-5p. L'ampio cluster a cui appartiene questo microRNA è coinvolto nella genesi di diverse neoplasie umane tra i quali i linfomi B

dove si assiste ad una diminuzione della proteina pro-apoptotica Bim¹². A differenza di quanto segnalato nell'uomo, nelle CLL da noi analizzate, non si è riscontrato una diminuzione dei livelli di mir-15 e mir-16, ma un aumento di mir-155, nell'uomo associato alle forme di CLL con prognosi peggiore e ai linfomi DLBC².

CONCLUSIONI

I nostri dati, pur se preliminari, hanno messo in luce la possibilità di indagare anche nel cane il ruolo svolto dai Mirna, sia in cellule ematopoietiche normali sia neoplastiche e consentono di ipotizzare una loro alterazione alla base della patogenesi delle principali neoplasie linfoidi. La quantificazione di miR-155 nelle B-CLL, di miR-181a e miR-29b nei linfomi T, e l'espressione di miR-17-5p nei linfomi B, potrebbero costituire un interessante progresso per l'indagine sull'oncogenesi linfoidi del cane anche se il ruolo di queste molecole nella prognosi e nella diagnosi dovrà essere chiarito ulteriormente.

BIBLIOGRAFIA

1. Chen C.Z. et al.: MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science*. 2004, 303: 83-86.
2. Garzon R. et al.: MicroRNAs in normal and malignant hematopoiesis. *Current opinion in hematology*, 2008, 15:352-358.
3. Calin GA et al.: Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *PNAS* 2002, 99:15524-9.
4. Boggs R.M. et al. Identification, amplification and characterization of miR-17-92 from canine tissue. *Gene*. 2007, 404:25-30.
5. Boggs R.M. et al.. MicroRNA expression in canine mammary cancer. *Mamm Genome*. 2008, 19:561-9.
6. Zhou D. et al.: Genome-wide computational analyses of microRNAs and their targets from *Canis familiaris*. *Comput Biol Chem*. 2008, 32:60-5.
7. Giulietti A. et al.. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*, 2001, 25:386-401.
8. Iorio M.V. et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res*. 2005, 65:7065-70.

9. Merkerova M, et al. Differential expression of microRNAs in hematopoietic cell lineages. *Eur J Haematol.* 2008, 81:304-10.
 10. Fabbri M. et al.: MicroRNAs and noncoding RNAs in hematological malignancies: molecular, clinical and therapeutic implications. *Leukemia.* 2008, 22:1095-105.

11. Calin GA et al.. The role of microRNA and other non-coding RNA in the pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2007, 20:425-37.
 12. Inomata M et al.: MicroRNA-17-92 down-regulates expression of distinct targets in different B-cell lymphoma subtypes. *Blood.* 2009, 113:396-402.

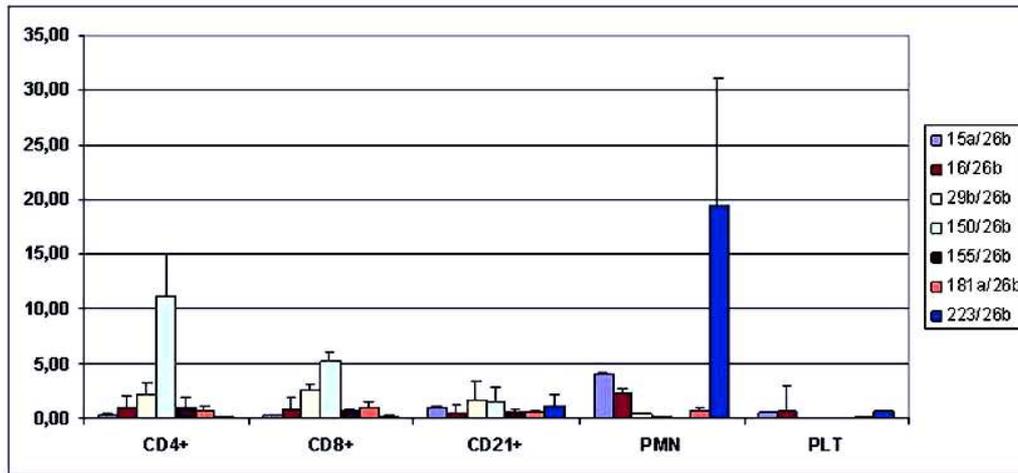


Figura 1: livelli d’espressione dei miRNA nelle sottopopolazioni leucocitarie isolate espressi come rapporto copie Mirna target/copie mir-26b.

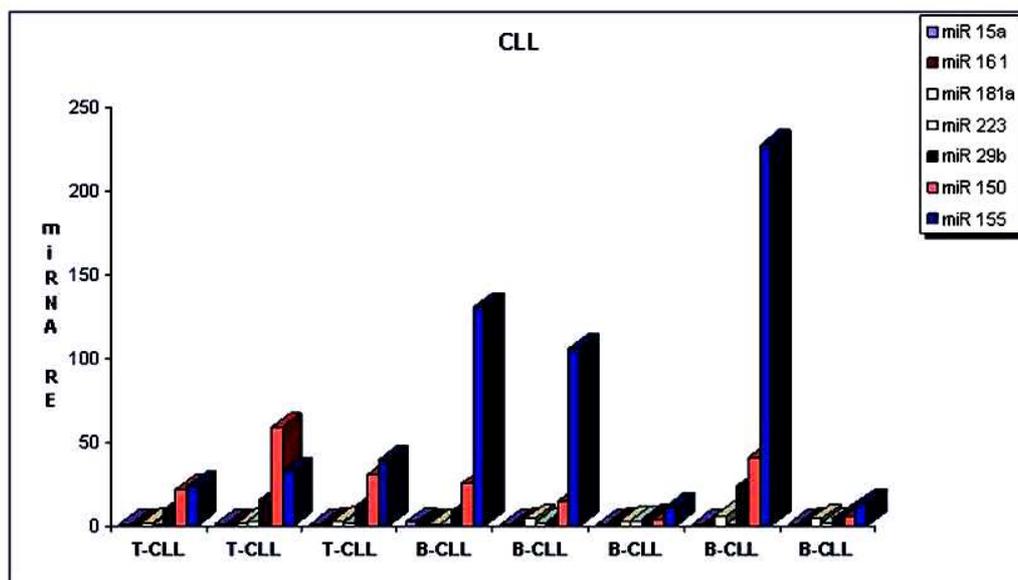


Figura 2: Espressione relativa dei MicroRNA nei casi di leucemia linfocitica cronica

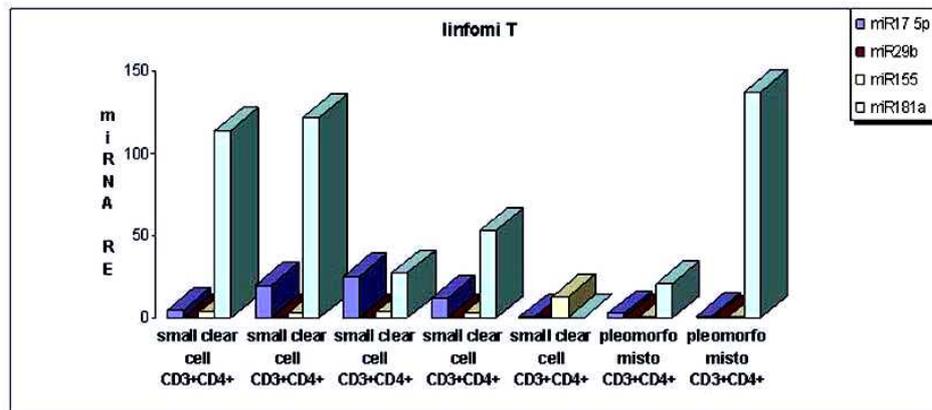


Figura 3: Espressione relativa dei MicroRNA nei casi di linfoma T

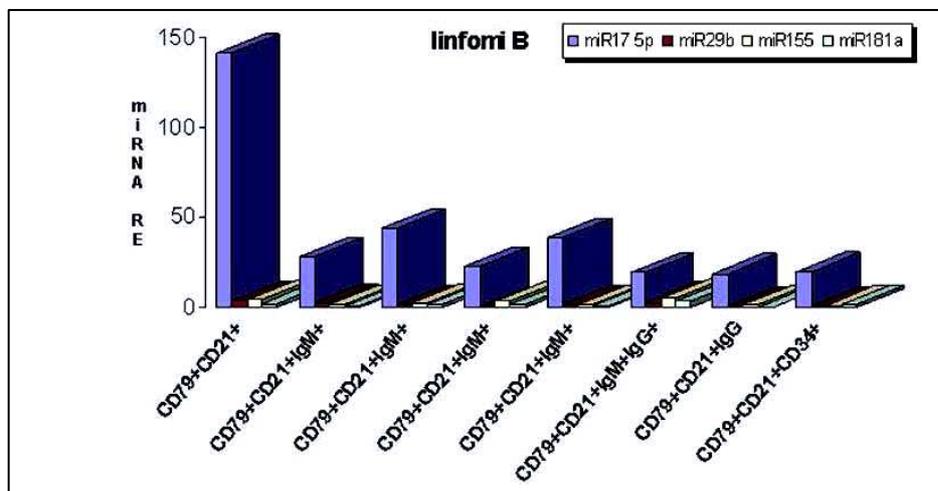


Figura 4: Espressione relativa dei MicroRNA nei casi di linfoma B

MICRORNA EXPRESSION PROFILE IN CANINE LYMPHOID NEOPLASM

MicroRNAs are regulatory noncoding RNAs involved in cell growth and differentiation with tissue and time specific expression pattern, disruption of which may be associate with oncogenesis. In this study, the expression of some mature miRNAs was quantitated in canine lymphoid malignancies and in normal hematopoietic subpopulations. The results revealed different patterns of miRNA expression in normal blood cells compared to neoplastic cells. MiR-150, miR-155 and miR-29b were preferentially expressed in normal lymphocytes, whereas miR-223 and miR-15a were preferentially expressed in myeloid cells. MiR-17-5p and miR181a were significantly upregulated in B-cell lymphoma and in T-cell lymphoma respectively. miR-29b was downregulated in T-cell lymphoma. There was also an appreciable upregulation of miR-155 in B-CLL. These preliminary data suggest that, also in dogs, the different miRNAs expression could reflect developmental lineage and tumor differentiation state and miRNA profiling could be useful in further studies about pathogenesis of haematological malignancies.

Key words: MicroRNA, lymphoma, chronic lymphocytic leukaemia, dog

DIAGNOSI ULTRASTRUTTURALE DI MIOPERICITOMA CUTANEO NEL CANE

Palmieri Chiara, Cimini Maria, Avallone Giancarlo¹, Roccabianca Paola¹, Damiano Stefanello², Della Salda Leonardo

Sezione di Patologia Generale ed Anatomia Patologica Veterinaria, Dip. Scienze Biomediche Compare, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Teramo; ¹ DPAV, Sezione di Anatomia Patologica e Patologia Aviare, ² Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Milano

In medicina umana, il miopericitoma è caratterizzato istologicamente dalla proliferazione perivascolare concentrica di cellule neoplastiche con parziale differenziazione mioide. Recentemente questa entità tumorale è stata descritta nel cane e nel ratto F344, ma non sembrano esistere studi sulle caratteristiche ultrastrutturali del miopericitoma nella specie canina. Un cane rottweiler femmina, di 11 anni, presentava una neoformazione all'arto anteriore sinistro che, istologicamente, era contraddistinta da un modello di crescita con fasci intrecciati di cellule fusate, rari vortici perivascolari, numerosi vasi ramificati a parete sottile (modello di crescita *staghorn*) ed occasionali cellule neoplastiche multinucleate a corona. L'esame immunohistochimico evidenziava positività a calponina (> 75%), miosina, vimentina, CD34 (50-75%), pan-actina, actina muscolare liscia, desmina, laminina (5-25%), negatività a smoothelina, caldesmona, CD18, FVIII, CD31, GFAP, S100, NSE, citocheratine, Melan-A, 3G5. In base alle analisi sopraindicate veniva posta una diagnosi di neoplasia perivascolare con una diagnosi differenziale tra miopericitoma e angioleiomioma. All'esame ultrastrutturale le cellule neoplastiche avevano forma allungata, nucleolo reticolato attivo, processi citoplasmatici ramificati, variabile sviluppo della lamina esterna, moderato numero di vescicole pinocitotiche, rare densità focali subplasmalemmatiche, rari miofilamenti, fasci di vimentina, cisterne dilatate del reticolo endoplasmatico rugoso, un numero variabile di mitocondri, occasionalmente ad anello e rare gocce lipidiche.

Lo studio ultrastrutturale è risultato essenziale per la diagnosi definitiva di miopericitoma cutaneo (cellule neoplastiche con processi citoplasmatici ramificati, lamina esterna, vescicole pinocitotiche, miofilamenti, densità subplasmalemmatiche) e nella differenziazione con altre entità caratterizzate istologicamente da crescita concentrica perivascolare, quali emangiopericitoma ed angioleiomioma/sarcoma.

Parole chiave: miopericitoma, vortici perivascolari, microscopia elettronica, cute, cane

ULTRASTRUCTURAL DIAGNOSIS OF CANINE CUTANEOUS MYOPERICYTOMA

In humans, myopericytoma is a neoplastic entity characterized histologically by a concentric perivascular proliferation of neoplastic cells with transitional myoid differentiation. Myopericytoma has been described in dogs and Fischer rats, however their ultrastructural characterization is missing in dogs. An 11-year-old Rottweiler had a subcutaneous mass in the left anterior limb. Histology was characterized by interlacing bundles of spindle cells, perivascular whorls, staghorn growth, and occasional multinucleated neoplastic cells. The tumour was calponin (> 75%), myosin, vimentin, CD34 (50-75%), pan-actin, smooth muscle actin, desmin, laminin (5-25%) positive and smoothelin, h-caldesmon, CD18, FVIII, CD31, GFAP, S100, NSE, cytokeratin, Melan-A, 3G5 negative. Histology and immunohistochemistry were consistent with a perivascular tumour (myopericytoma or angioleiomyoma). On electron microscopy neoplastic cells were spindle, with active reticulated nucleolus, complex cytoplasmic processes, variably developed external lamina, moderate number of pinocytotic vesicles, rare focal subplasmalemmal densities, rare myofilaments, vimentin bundles, dilated rough endoplasmic reticulum, variable number of mitochondria, occasionally ring-shaped, and rare lipid droplets. Ultrastructural analysis was diagnostic for cutaneous myopericytoma and allowed the differential diagnosis with other neoplasms characterized by perivascular concentric growth.

Key words: myopericytoma, perivascular whorls, electron microscopy, skin, dog

ESPRESSIONE IMMUNOISTOCHEMICA DI VEGF, FLK1 E CTGF NEI TUMORI PERIVASCOLARI DEL CANE

Avallone Giancarlo*, Rebughini Alice*, Stefanello Damiano[§], Roccabianca Paola*

**DIPAV- Sezione di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviaria; [§]DSC- Sezione di Clinica Chirurgica, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Milano*

I sarcomi dei tessuti molli (STM) costituiscono il 15% delle neoplasie cutanee e sottocutanee del cane al cui interno sono compresi i tumori perivascolari (TPV). Nei STM dell'uomo l'espressione del *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) è correlata a stadio, grado e prognosi ed il fattore fibrogenico *Connective Tissue Growth Factor* (CTGF) è coinvolto nella loro patogenesi. Al fine di identificare il ruolo patogenetico e prognostico di tali fattori di crescita, è stata studiata l'espressione di VEGF, del suo recettore Flk1 e di CTGF in 28 casi di TPV di cane, e ne sono stati valutati il grado e l'indice di proliferazione (IP). La maggioranza era di grado I (13) e II (13). In 23 casi più del 70% delle cellule esprimeva VEGF, ed in 14/23 risultava molto intensa nel 5-20% delle cellule neoplastiche. In 21/23 casi Flk1 era espresso in più del 70% delle cellule. Due dei 23 casi erano negativi per Flk1 ed erano caratterizzati dall'IP più basso del gruppo. In 17 casi CTGF era espresso in più di 70% delle cellule, in 3 casi tra il 5% ed il 20% ed 8 casi erano negativi. Degli 8 casi negativi 5 erano di primo grado e 3 di secondo. L'espressione di VEGF o Flk1 non era correlata all'indice mitotico, grado o IP, né al tipo specifico di TPV. Tuttavia, nel gruppo di TPV con elevata espressione di VEGF, la negatività a Flk1 corrispondeva ad un IP basso, suggerendo che, in presenza del recettore specifico, VEGF abbia un'attività autocrina e paracrina sulle cellule neoplastiche. La presenza di una sottopopolazione neoplastica con espressione di VEGF intensa suggerisce inoltre che i TPV siano composti da una popolazione eterogenea con presenza di cloni con marcata attività sintetica di fattori di crescita in grado di stimolare la proliferazione neoplastica. Una casistica più ampia è necessaria per confermare tali ipotesi tramite indagine statistica.

Parole chiave: sarcoma, tumori perivascolari, VEGF, Flk1, cane

IMMUNOISTOCHEMICAL EXPRESSION OF VEGF, FLK1 AND CTGF IN CANINE PERIVASCULAR WALL TUMORS

Soft tissue sarcomas (STS) comprise 15% of canine cutaneous and subcutaneous tumors, comprising perivascular wall tumors (PWTs). VEGF expression in human STS is related with grade, stage and prognosis and CTGF has a role in their pathogenesis. To identify the pathogenetic and/or prognostic role of these factors, the expression of VEGF, its receptor Flk1 and CTGF was studied in 28 canine PWTs. The grade and the proliferation index (PI) were evaluated. The majority were grade I and II. In 23 cases more than 70% of the cells expressed VEGF, and in 14 of these was more intense in 5% to 20% of cells. In 21 out of 23 cases, Flk1 was expressed in more than 70% of cells. Two out of 23 cases were Flk1 negative and had a low PI. In 17 tumors more than 70% of the cells expressed CTGF, in 2 cases by 5-20% of cells and 8 cases were negative. Of the negative tumors, 5 were grade 1 and 3 cases were grade 2. Although the expression of VEGF or Flk1 alone was not correlated with grade, mitotic index or PI, in the group of PWT with high VEGF expression, the negativity to Flk1 was associated with the lowest PI, suggesting a possible autocrine and paracrine activity of VEGF. Furthermore, the presence of a subpopulation of cells with a higher VEGF expression suggests that PWTs contain a heterogeneous population of cell deriving from the selection of clones with high production of factors acting on the other neoplastic cells. A wider caseload is required to confirm these hypotheses by statistical analysis.

Key words: sarcoma, perivascular wall tumor, VEGF, Flk1, dog

STUDIO ISTOLOGICO ED IMMUNOISTOCHEMICO DEL SERTOLIOMA DEL CANE

Banco Barbara, Gerosa Ester, Giudice Chiara, Veronesi M. Cristina*, Grieco Valeria

*Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria – Sezione di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviaria – *Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie – Facoltà di Medicina Veterinaria – Università degli Studi di Milano*

In medicina umana sono presenti numerosi studi istologici ed immunohistochimici dedicati alle cellule del Sertoli ed alle relative neoplasie, per altro nell'uomo piuttosto rare. Di contro, nel cane, ove il sertolioma è molto frequente, gli studi sono limitati e, inoltre, nessuno di essi illustra, come nell'uomo, gli aspetti immunohistochimici delle cellule del Sertoli seguendone il percorso maturativo. A questo scopo sono stati analizzati 3 testicoli normali di cane adulto, 3 testicoli di cuccioli neonati e 20 tumori di cani adulti diagnosticati come sertolioma. Per tutti i campioni è stato eseguito un esame istologico con EE ed un esame immunohistochimico (ABC) con anticorpi diretti contro CKAE1/AE3 (1:3000), vimentina (1:1000), desmina (1:300) e inibina α (1:40). All'esame istologico, 13/20 dei tumori considerati sono stati descritti come sertolioma di tipo classico mentre 7 sono stati classificati come "lipid rich". Per quanto riguarda l'esame immunohistochimico, in tutti i testicoli normali, nelle porzioni di parenchima normale adiacente alle neoplasie e in 2 neonati su 3, le cellule del Sertoli sono risultate positive alla sola vimentina. In un solo neonato si registravano, a fronte di una completa negatività alla vimentina, positività sia all'inibina che alle citocheratine. Per quanto riguarda i sertoliomi, tutti i tumori risultavano positivi alla vimentina, 13/22 erano positivi all'inibina, 7/22 risultavano positivi alle citocheratine e 6/22 alla desmina.

I risultati istologici suggeriscono che il sertolioma "lipid rich", essendo ben rappresentato, meriterebbe di essere segnalato come variante a parte del sertolioma nella classificazione del WHO veterinario così come è segnalata a parte in quello umano. Quanto ai risultati immunohistochimici, essi suggeriscono che le cellule del Sertoli neoplastiche vadano in contro ad una certa sdifferenziazione, tornando ad esprimere markers di immaturità cellulare quali citocheratine, desmina ed inibina che non trovano riscontro nel testicolo maturo.

Parole chiave: cane, sertolioma, testicolo, immunohistochimica

HISTOLOGICAL AND IMMUNOHISTOLOGICAL STUDY OF CANINE SERTOLIOMA

In veterinary literature histological and immunohistochemical aspects of canine sertolioma are poorly investigated and data on normal testes of mature and immature dogs are absent. To evaluate the expression of Sertoli cell markers in normal and neoplastic canine testes, formalin fixed and paraffin embedded sections from 3 normal, 3 newborn dog testes and 20 canine sertolioma were processed for histology and immunohistochemistry (ABC method) with antibodies against CKAE1/AE3 (1:3000), vimentin (1:1000), desmin (1:300) and inhibin α (1:40). Histologically, 13/20 tumors were classified as classical sertolioma while 7, showing intracytoplasmic vacuoles, were considered "lipid rich". In normal and in 2 immature testes, Sertoli cells were exclusively vimentin positive. Only in one newborn dog Sertoli cells were positive for cytokeratins and inhibin and completely negative for vimentin. All sertoliomas were positive for vimentin, 13/22 were inhibin α positive, 7/22 were cytokeratins positive and 6/22 were desmin positive.

We speculate that the expression of cytokeratins, inhibin α and desmin observed in all Sertoliomas and not in mature testes may be a manifestation of de-differentiation of neoplastic Sertoli cells. Moreover, we suggest that the "lipid rich" variant should be included in veterinary WHO classification as it is already included in the human one.

Key words: dog, sertolioma, testis, immunohistochemistry

MALATTIA DELLE MUCOSE: ALTERAZIONI IMMUNOFENOTIPICHE IN BOVINE CON PATOLOGIA SPONTANEA

Binanti Diana, Rondena Marco, Lorenzi Valentina, Pravettoni Davide*, Gelmetti Daniela *, Finazzi Mario, Riccaboni Pietro

*Facoltà di Medicina Veterinaria – Polo di Lodi. Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria. *Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie. *Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lombardia e Emilia Romagna- via Bianchi 9, 25124 Brescia*

La Malattia delle Mucose (MM) è una grave malattia del bovino sostenuta dal *Pestivirus* responsabile anche della Diarrea Virale Bovina (BVDV). La MM offre spunti di ricerca molto stimolanti, infatti non sono ancora completamente chiariti né la distribuzione del virus né quali alterazioni vengano indotte dalla presenza e circolazione del virus stesso nell'organismo ospite. La malattia è una problematica estremamente attuale e rappresenta un importante ed oneroso problema di gestione sanitaria.

Il presente lavoro, attraverso l'utilizzo della tecnica immunoistochimica (IIC), ha lo scopo di dimostrare la presenza dell'agente patogeno nei tessuti dell'ospite e studiare le alterazioni immunofenotipiche ad esso associate.

Sono state valutate 9 bovine di età compresa fra i 15 giorni ed i 18 mesi con diagnosi clinica di MM e 2 soggetti morti per polmonite ed ascesso paravertebrale. Gli animali sono sottoposti ad autopsia per la conferma della diagnosi. Durante la necropsia sono stati prelevati campioni per gli esami istologici (Emmatossilina Eosina) ed immunoistochimici con anticorpi monoclonali: anti-BVDV, anti-CD 79 (linfociti B), MAC 387 (macrofagi), anti-MHC II e anti-Heat Shock Protein 72 (HSP72). L'esame anatomo-istopatologico ha confermato la diagnosi clinica di MM nei 9 soggetti con erosioni ed ulcere in tutto l'apparato digerente e necrosi delle strutture linfatiche. L'esame immunoistochimico ha dimostrato la presenza di BVDV solo nel citoplasma delle cellule epiteliali, sempre negative le strutture linfatiche. L'anticorpo anti-CD79 ha dimostrato modica deplezione linfocitaria centrollicolare. E' stata osservata ridotta espressione di MHC II sia nelle strutture epiteliali che linfoidi; mentre si è osservato un notevole incremento di espressione di HSP72 nella mucosa enterica. L'espressione solamente epiteliale dell'anticorpo anti-BVDV in soggetti con forme cliniche protratte è nota. Degna di approfondimento è la causa dell'immunodeplezione che, come in altre infezioni da pestivirus, sembrerebbe indotta da citochine espresse dall'ospite piuttosto che direttamente dal virus.

Parole chiave: bovino, malattia delle mucose, immunoistochimica

MUCOSAL DISEASE: IMMUNOPHENOTYPICAL ALTERATION IN SPONTANEOUS INFECTED CATTLE

Mucosal Disease (MC) is a contagious severe bovine disease due to *Pestivirus* inducing a major cause of economics loss in cattle industries.

The aim of this communication is to give an immunoistochemical detection of viral antigen in animal tissues and to evaluate the relate immunodepltion. Nine bovines (15 days to 18 months old) with MD and 2 (pneumonia and paravertebral abscess) were necropsied. Samples were taken and histological (HE) and immunohistochemical processed using antibodies against BVDV, CD79 (B lymphocytes), MAC 387 (macrophages), MHC II and HSP72. Morphologically scattered alimentary tract erosions and ulcers and severe lymph nodal follicular necrosis were observed. Immunohistochemistry epithelial BVDV expression was detected and loss of CD 79+ cells in lymphoid tissue follicular centres was observed. Reduced epithelial and lymphoid MHC II expression and increase of enterocytes HSP72 expression were also detected.

The BVDV expression only in the epithelial cells is consistent with a protracted infection. Further studies are required for a better comprehension of the real role of viral induced cytokines release in the lymph nodal follicular necrosis pathogenesis.

Key words: bovine, mucosal disease, immunohistochemistry

STUDI PRELIMINARI DELL'ESPRESSIONE DI OvPV-3 NEL CARCINOMA SQUAMOCELLULARE OVINO MEDIANTE TECNICHE DI IBRIDAZIONE *IN SITU*

Anfossi Antonio G.¹, Cubeddu Tiziana¹, Antuofermo Elisabetta¹, Cabras Francesca L.¹, Burrai Giovanni¹, Foddai Gisella¹, Pittau Marco², Alberti Alberto², Pintore Francesca², Pirino Salvatore¹

Dipartimento di Patologia e Clinica Veterinaria. Facoltà di Medicina Veterinaria. Università degli Studi di Sassari. ¹ Sezione di Patologia Generale e Anatomia Patologica; ² Sezione di Malattie Infettive.

Recenti studi molecolari (condotti dal nostro gruppo di ricerca) hanno permesso di isolare e caratterizzare un Papillomavirus (OvPV-3-SAR) da carcinomi squamocellulari (SCC) nella pecora. Mentre è noto che la luce agisce come cofattore per lo sviluppo del tumore, a tutt'oggi non è ancora stato individuato il papillomavirus (PV) associato allo sviluppo del tumore.

I tipi di papillomavirus ovini (OvPV-1, OvPV-2) descritti in Australia non sembrano essere associati a tumori maligni. L'intero genoma di OvPV-3 è stato amplificato con Rolling Circle Amplification (RCA), caratterizzato mediante l'uso di differenti enzimi di restrizione e clonato in pUC19. Il sequenziamento del genoma ha permesso di evidenziare almeno 5 orf, due delle quali codificanti per gli oncogeni E6 ed E7. OvPV-3 manca della orf codificante per E5, e mantiene il motivo L-X-C-X-E in E7, che lega la proteina del retinoblastoma e determina la natura esclusivamente epiteliale delle neoformazioni benigne e maligne nelle pecore affette. Questo ultimo aspetto è peculiare, in quanto i PV descritti negli artiodattili hanno la caratteristica di mancare del motivo L-X-C-X-E e causare fibropapillomi. Le analisi filogenetiche confermano la divergenza di OvPV-3 dai □-PV, a differenza della quasi totalità dei PV degli artiodattili.

Parole chiave: papillomavirus, carcinoma squamocellulare, ibridazione in situ

PRELIMINARY STUDY OF OVPV-3 EXPRESSION IN SHEEP SQUAMOUS CELL CARCINOMA BY *IN SITU* TECHNIQUES

Several papillomaviruses have been isolated from squamous cell carcinomas (SCC) of Vertebrates. Although it is commonly accepted that light is a cofactor for ovine SCC, sheep papillomaviruses described to date are only associated to papillomas and fibropapillomas. We recently characterized a new sheep papillomavirus isolated from SCCs. At least five open reading frames were identified, two of them encoding for the oncogenes E6, E7. Interestingly, the virus lacks a canonical orf for the E5 and carries a L-X-C-X-E motif in E7, similarly to most of the epidermotrophic papillomaviruses.

Key words: papillomavirus, squamous cell carcinomas, in situ hybridization

DISTRIBUZIONE DELLA PROTEINA PRIONICA PATOLOGICA (PrP^{Sc}) IN ORGANI DI OVINI AFFETTI DA SCRAPIE E DA CONCOMITANTI PATOLOGIE INFIAMMATORIE CRONICHE

Cancedda Giovanna Maria¹, Marruchella Giuseppe², Di Guardo Giovanni², Demontis Francesca¹, Maestrale Caterina¹, Santucci Cinzia¹, Macciocu Simona¹, Saba Mariangela², Denti Stefano¹, Ligios Ciriaco^{1*}

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, “G. Pegreffi” – Sassari. ²Università degli Studi di Teramo, Facoltà di Medicina Veterinaria, Dipartimento di Scienze Biomediche Comparete, Teramo

Nella scrapie ovina la PrP^{Sc} si accumula nel sistema linfo-reticolare (SLR) e nel sistema nervoso centrale (SNC). Tuttavia, come dimostrato in modelli murini e nell'ospite naturale, uno stato infiammatorio di tipo cronico può estendere il tropismo dei prioni anche ad altri organi. Questo avviene attraverso la induzione della maturazione delle cellule follicolari dendritiche (FDC), le quali stanno alla base della formazione e mantenimento dei follicoli linfatici secondari.

Diverse patologie degli ovini danno origine a quadri infiammatori ad evoluzione cronica, di conseguenza in molti casi la distribuzione della PrP^{Sc} nell'animale con scrapie potrebbe essere ectopica con importanti implicazioni pratiche. In questo lavoro, abbiamo valutato la distribuzione di PrP^{Sc} in pecore con scrapie e concomitanti infiammazioni croniche di tipo granulomatoso e linfoproliferativo a diversa eziologia ed a carico di differenti organi. Mediante tecniche immunocistochemiche (IHC) e di western blotting (WB) è stata determinata la distribuzione della PrP^{Sc} ed effettuata la caratterizzazione fenotipica cellulare nelle lesioni infiammatorie in pecore clinicamente o preclinicamente affette da scrapie naturale (n. 39) e sperimentale (n. 9). I risultati ottenuti dimostrano che negli organi con infiammazioni croniche la PrP^{Sc} si accumula solo in presenza di follicoli ectopici contenenti le FDC e strutturalmente organizzati analogamente ai follicoli secondari. Al contrario, la PrP^{Sc} risulta assente a livello di tutti i granulomi esaminati, anche in quelli adiacenti ai follicoli linfatici ectopici con abbondanti depositi di PrP^{Sc}. Sulla base di questi risultati si può affermare che la PrP^{Sc} non si accumula in assenza di FDC, confermando così il ruolo cruciale che tali cellule hanno nella patogenesi della malattia a livello di replicazione e deposizione di PrP^{Sc} nell'SLR prima della neuro-invasione. Negli ovini affetti da scrapie, la concomitante presenza di foci d'infiammazione cronica potrebbe pertanto costituire un potenziale rischio di contaminazione prionica a livello di organi non sospetti solo in presenza di lesioni infiammatorie con neoformazione di follicoli linfatici.

Parole chiave: infiammazione cronica, granuloma, scrapie

PATHOLOGICAL PRION PROTEIN (PrP^{Sc}) DISTRIBUTION IN CHRONICALLY INFLAMED ORGANS OF SCRAPIE-AFFECTED SHEEP

During sheep scrapie PrP^{Sc} first accumulate in the lymphoreticular system (LRS) and finally in the central nervous system (CNS). It has been demonstrated that, both in mouse models and in natural host, pathological prion protein (PrP^{Sc}) deposition may expand to a range of other unsuspected organs affected by chronic lymphoproliferative inflammation. Here, we investigated PrP^{Sc} distribution in scrapie-affected sheep with granulomatous or lymphoproliferative chronic inflammations, which are very common disorders in small ruminants. To do this, PrP^{Sc} detection was carried out by immunohistochemistry (IHC) and western blotting (WB), with immuno-phenotyping of the inflammatory cells being also performed, in sheep with clinical and preclinical natural (n. 38) and experimental scrapie (n. 9). Our data demonstrate that ectopic PrP^{Sc} accumulates exclusively in well-organized neoformed lymphoid follicles with follicular dendritic cell (FDCs). On the contrary, no PrP^{Sc} deposition was found in the granulomas, even when closely located to the above-mentioned neoformed lymphoid follicles. These findings suggest that, in sheep with coexistence of scrapie and inflammatory conditions, there may be a risk of prion contamination in unsuspected organs only in presence of neoformed lymphoid follicles.

Key words: chronic inflammation, granuloma, scrapie

STUDIO SULLA PRESENZA DI *MYCOBACTERIUM CAPRAE* IN ALLEVAMENTI BOVINI E BUFALINI DELLA REGIONE CAMPANIA

Ascione Grazia¹, Iovane Valentina², Cozza Debora¹, Scognamiglio Francesca¹, Iuliano Silvia¹, Galiero Giorgio¹, Paciello Orlando²

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno. Sezione di Portici. ²Dipartimento di Patologia e Sanità animale – settore di Anatomia Patologica. Università degli Studi di Napoli Federico II

La tubercolosi bovina (TBC), viene considerata una patologia con effetti socio-economici e di sanità pubblica di notevole rilevanza. La TBC colpisce l'uomo e gli animali e si presenta con decorso per lo più cronico e depauperante, presenza di processi produttivi di tipo granulomatoso, con formazione di noduli e processi essudativi. Le lesioni possono coinvolgere tutti gli organi e i tessuti con particolare frequenza i linfonodi, i polmoni, l'intestino, il fegato, la milza, e le sierose pleurica e peritoneale. La patologia nella specie bovina e bufalina è sostenuta, perlopiù, da *M. bovis* appartenente al *M. tuberculosis complex*. L'esposizione del bestiame all'aerosol di *M. bovis* è considerata la via più frequente di contagio. Dal 2004 al 2008 presso l' Istituto Zooprofilattico del Mezzogiorno (Portici) sono stati isolati 447 ceppi di *Mycobacterium bovis*, da bovini e bufali abbattuti nell'ambito del piano di risanamento della tubercolosi. Tutti gli stipiti isolati sono stati inviati al Centro di Referenza Nazionale per la Tubercolosi Bovina presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lombardia ed Emilia per la tipizzazione biomolecolare. Complessivamente 422 stipiti sono stati classificati come appartenenti alla specie *bovis* e 25 alla specie *caprae*. I risultati ottenuti evidenziano una prevalente diffusione del *M. bovis* nel territorio campano. Il dato epidemiologicamente più rilevante è la segnalazione di 25 focolai sostenuti da *M. caprae*, di cui 6 riguardano allevamenti bufalini. La presenza di tale specie rappresenta un elemento di novità e al contempo di preoccupazione in quanto mancano certezze in merito alle modalità di ingresso nel nostro territorio e alla sua capacità di diffusione oltre che nel bovino, anche nel bufalo. La presenza di ceppi di *M. caprae* inoltre rende necessaria una sistematica applicazione delle tecniche di biologia molecolare per una diagnosi precisa e definitiva dello stipite coinvolto, laddove i tradizionali test basati sulla morfologia, sulle caratteristiche fenotipiche e sulle proprietà biochimiche delle diverse specie, possono risultare indaginosi e non definitivi.

Parole chiave: *Mycobacterium caprae*, tubersolosi, bovini, bufali

STUDY ON THE PRESENCE OF *MYCOBACTERIUM CAPRAE* IN CATTLE AND BUFFALOES IN CAMPANIA REGION

The bovine tuberculosis (TB), is considered a disease with very high socio-economic and public health effects and significant impact on international trade of animals and products of animal origin. TBC affects humans and animals with a chronic course. The disease in cattle and buffalo is supported by *M. bovis* belonging to the *M. tuberculosis complex*. From 2004 to 2008 at the Istituto Zooprofilattico del Mezzogiorno (Portici) were isolated 447 strains of *Mycobacterium bovis*, from cattle and buffaloes killed as part of the recovery plan of tuberculosis. All frames isolates were sent to the National Reference Center for Tuberculosis at the Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lombardia and Emilia for biomolecular typing. A total of 422 frames were classified as belonging to the species *bovis* and 25 *caprae*. The results show a predominant spread of *M. bovis* in Campania. The data epidemiologically most relevant reporting outbreaks of 25 supported by *M. caprae*, of which 6 concern buffaloes herds. The presence of this species represents a new element and the same concern as lacking certainty about the mode of entry into our territory and its ability to spread as well as in cattle and buffalo.

Keywords: *Mycobacterium caprae*, tuberculosis, cattle, buffalo

PATHWAYS MOLECOLARI ALLA BASE DELLA CANCEROGENESI UROTELIALE INDOTTA DAL PAPILOMAVIRUS BOVINO

Corteggio A., Urraro C., Roperto F., Borzacchiello G. *

**Dipartimento di Patologia e Sanità animale – Sezione di Patologia generale ed anatomia
patologica – Università degli Studi di Napoli Federico II*

Le neoplasie della vescica urinaria dei bovini sono causate all'azione sinergica del papillomavirus bovino tipo 2 (BPV-2) e di alcune sostanze oncogene presenti nella Felce (*Pteridium aquilinum*). I meccanismi di trasformazione cellulare mediati dall'azione degli oncogeni E5 ed E7 del BPV sono in generale poco noti. In corso di neoplasie vescicali spontanee indotte dal BPV, E5 si lega fisicamente alla subunità β del recettore per il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF β -R) attivandolo. Questo meccanismo (trasformazione virocrina) viene considerato il primo step della cancerogenesi BPV indotta. L'obiettivo del presente lavoro è stato quello di valutare alcuni pathways molecolari indotti dall'attivazione recettoriale. A tale scopo in campioni di neoplasie vescicali e di tessuto sano sono stati valutati mediante co-immunoprecipitazione e western blotting: 1) l'espressione del PDGF β -R fosforilato (p-PDGF β -R); 2) il legame fisico tra il p-PDGF β -R e la subunità 85 della fosfoinositolo – 3 chinasi (p85-PI3-K); 4) l'attivazione del pathway PI3K-Akt- ciclina D3; 5) l'attivazione di JUN (p-JUN) e JNK (p-JNK). I dati ottenuti dimostrano che nella cancerogenesi uroteliale spontanea indotta dal BPV, il PDGF β -R è maggiormente fosforilato e si lega alla p85-PI3K attivando il pathway PI3K-Akt-ciclina D3. In particolare, le proteine Akt e ciclina D3 sono iperespresse nelle neoplasie ed i livelli di fosforilazione di p-Akt, p-JUN e p-JNK sono analogamente maggiori nel tessuto tumorale rispetto al normale. Tali risultati ci inducono ad ipotizzare che l'elevata attivazione dei segnali di proliferazione cellulare siano trasdotti dall'interazione tra l'oncogene E5 e il PDGF β -R. Questo studio apre un nuovo scenario per la comprensione dei meccanismi eziopatogenetici alla base dei tumori della vescica urinaria del bovino.

Parole chiave: neoplasie della vescica urinaria, papillomavirus bovino, PDGF β -R, trasduzione del segnale

INTRODUZIONE

Le neoplasie della vescica urinaria dei bovini sono dovute all'azione sinergica del BPV e di alcune sostanze oncogene presenti nella Felce (*Pteridium aquilinum*) (Campo et al., 1992; per una rassegna completa sull'argomento vedi Borzacchiello e Roperto, 2008). E5 è la più importante oncoproteina del BPV. Nelle neoplasie vescicali spontanee del bovino E5 è espressa e si lega fisicamente al PDGF β -R attivandolo (Borzacchiello et al., 2003, 2006, 2007). Questa interazione viene considerata il primo step della cancerogenesi BPV indotta. Tuttavia, i segnali mitogeni a valle dell'attivazione recettoriale non sono ancora conosciuti.

Il pathway Fosfoinositolo-3 chinasi (PI3K) -AKT è alterato in numerosi tumori umani. AKT regola molecole effettrici coinvolte nei processi di apoptosi e ciclo cellulare (Cantley et al., 1999). È stato dimostrato che l'attivazione del pathway PI3K-AKT si correla con un aumento dell'espressione delle cicline D e che la ciclina D3 è overespressa in numerosi tumori umani.

Inoltre, è stato dimostrato che c-JUN NH2-terminal kinase (JNK) e c-JUN sono attivate da BPV E5 risultando iperesse in sarcoidi associati ad infezione da BPV (Petti et al., 2008; Borzacchiello et al., 2009). JNK è una chinasi che risulta essere coinvolta nei processi di trasformazione neoplastica (Davis, 2000). JNK è attivata da segnali mitogeni e fosforila il fattore di trascrizione c-JUN. Questo si complessa con C-fos formando il fattore di trascrizione AP1 che upregola una serie di geni coinvolti nel processo di proliferazione cellulare (Davis, 2000). L'attivazione di JNK può essere regolata dal signaling di AKT (Kim et al., 2002). Inoltre è stato recentemente proposto che l'oncoproteina E5 sia di papillomavirus umano (HPV) che bovino induce l'attivazione del pathway PI3K-AKT.

L'obiettivo del presente lavoro è stato quello di valutare l'espressione del pathway PI3K-AKT e di fosfo-JUN (p-JUN) e fosfo-JNK (p-JNK) in neoplasie vescicali di bovino in cui era stata valutata precedentemente l'espressione di E5 ed il suo legame fisico con il PDGF β -r fosforilato (p-PDGF β -r) (Borzacchiello et al., 2006).

MATERIALI E METODI

Sono stati esaminati 4 campioni di tumore (T1-T4) prelevati al mattatoio dalle mucche affette da

ematuria enzootica cronica. I 2 campioni di mucosa normale (N1 and N2) sono stati prelevati da mucche sane. I campioni sono stati divisi in due parti: una parte fissata in formalina al 10% per l'analisi istologica, l'altra parte congelata – 80°C per l'analisi molecolare. Per le indagini istologiche i campioni fissati in formalina sono stati inclusi in paraffina, tagliati a 5 μ m e colorati routinariamente con ematossilina-eosina (Bioptica, Milano). I campioni di tumore sono rappresentativi di una serie di neoplasie positive alla PCR per il DNA di BPV-2 e positivi mediante immunoistochimica per E5, PDGF β -r and p-PDGF β -r (Borzacchiello et al., 2006).

Co-immunoprecipitazione and SDS-PAGE/Western blotting

I campioni sono stati omogenizzati nel buffer JS (50m M Hepes pH 7.5, 150mM NaCl, 1% glicerolo, 1% Triton, 150 μ M MgCl₂, 5 mM EGTA) contenente 20 mM sodio pirofato, 0,1 mg/ml aprotinina, 2 mM PMSF, 10 mM sodio ortovanadato (Na₂VO₃), and 50 mM NaF. Le proteine sono state dosate mediante Bio-Rad protein assay kit. 100 μ g di omogenato per ogni campione è stato immunoprecipitato con 2 μ g/ml di anticorpo anti p-PDGF β -r (Santa Cruz Biotechnology) per una notte a 4°C. Ai campioni sono stati aggiunti 20 μ l di beads di Sepharosio A-G/plus (Santa Cruz) ed incubati in agitazione per 1 ora a 4°C. Gli immunoprecipitati sono stati risospesi in Laemmli buffer (SDS, Tris-HCl pH 6.8, glicerolo, blu di bromofenolo, β -mercaptoetanolo) and analizzati mediante SDS PAGE e western blotting. La membrana di PVDF è stata incubata con l'anticorpo anti-p85-PI3K (Upstate Biotechnology).

SDS PAGE/Western blotting

30 μ g di omogenato proteico è stato bollito per 5 minutes in Laemmli buffer e caricato su di un gel al 10% di bis/acrilamide gel e sottoposto ad elettroforesi. Dopo la separazione su gel, i campioni sono stati blottati su di un filtro di PVDF mediante un apparato di Trans-Blot (Bio-Rad).

La membrana è stata bloccata con 5% latte non grasso in una soluzione salina di Tris (TBS) RT, lavata con TBS-0.1% Tween, ad incubata con l'anticorpo primario anti-PI3K (p85) (Upstate Biotechnology) 1:2000 una notte a 4°C. Dopo una

serie di step di lavaggio la membrana è stata incubata con l'anticorpo secondario anti IgG coniugato a perossidasi (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) per 1 ora alla diluizione 1:2000. L'anticorpo legato è stato visualizzato mediante ECL (AmershamPharmacia Biotech). Le membrane sono state strippate con la soluzione per lo stripping (60 mM Tris-HCL pH 6.8, 2% SDS, 0,7% β -Mercaptoetanolo) e testate con i seguenti anticorpi primari: anti-actina 1 : 5000 (Calbiochem), per normalizzare i campioni caricati sul gel; anti-AKT 1 : 1000 (Cell Signaling Technology); anti-pAKT (pSer 473) 1 : 1000 (Cell Signaling Technology); anti-ciclina D3 1 : 500 (BD Pharmingen); anti-p-JNK 1: 2000 (BD Pharmingen); anti-p-JUN 1 : 2,000 (Upstate Biotechnology).

RISULTATI

Analisi istopatologica

Le neoplasie sono state classificate istologicamente in: Carcinoma uroteliale fortemente invasivo (T1), Carcinoma uroteliale di basso grado (T2), Carcinoma uroteliale anaplastico (T3), Carcinoma uroteliale in situ (T4). I due campioni normali microscopicamente non mostravano alcuna alterazione patologica.

Legame fisico tra p-PDGF β -r e PI3-K; espressione delle proteine del pathway PI3K-AKT ed espressione di p-JUN e p-JNK

I campioni di neoplasie e di tessuto sano sono stati sottoposti ad analisi biochimica mediante western blotting per testare l'espressione della subunità 85 di PI3K. Una significativa over-espressione della proteina è stata osservata nei tessuti tumorali rispetto a quelli normali (Fig.1a), suggerendo una upregolazione della proteina. Per verificare la possibile attivazione del pathway PI3-K-AKT da parte del p-PDGF β -r abbiamo verificato il legame fisico delle due molecole mediante co-immunoprecipitazione. Sia i campioni neoplastici che i campioni normali sono stati immunoprecipitati con l'anticorpo anti-p-PDGF β -r e testato la membrana su cui sono stati trasferiti gli immunoprecipitati con l'anticorpo anti-p85 PI3K. L'analisi mediante western blotting dimostra che la quota di PI3K precipitata nei neoplasie è maggiore di quella precipitata nelle mucose normali (Fig 1b). Questi risultati

suggeriscono che il p-PDGF β -r è in un complesso molecolare con PI3K nelle cellule della mucosa della vescica ma che il recettore è più attivo nelle neoplasie.

Abbiamo in seguito valutato i pathways molecolari a valle di PI3K e specificamente mediante analisi biochimica abbiamo testato l'espressione di AKT,p-AKT e ciclina D3. I diversi esperimenti di western blotting hanno rilevato un aumento dei livelli di AKT nei carcinomi rispetto alle mucose sane (Fig. 2). Per valutare lo stato di attivazione di AKT abbiamo effettuato un western blotting usando un anticorpo primario anti p-AKT. Questa analisi ha dimostrato che un forte aumento della proteina fosforilata nelle neoplasie T1 e T3 (Fig. 2). L'analisi dell'espressione di ciclina D3 rileva che la proteina è espressa solo nei campioni tumorali, suggerendo che la ciclina D3 è espressa a più alti livelli nei tumori che nei tessuti normali (Fig2).

Infine, abbiamo valutato i livelli di espressione di p-JNK e p-Jun, il substrato prevalente di JNK mediante western blotting usando anticorpi fosfo-specifici. Sia i livelli di p-JNK che di p-Jun sono aumentati nelle neoplasie rispetto ai campioni sani (Fig. 3).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Le neoplasie della vescica urinaria del bovino riconoscono un'eziologia multifattoriale. Infatti, oltre all'azione cancerogena di alcune sostanze presenti nella Felce aquilina (es. ptaquiloside), un ruolo preponderante è svolto dal BPV. Come già ampiamente dimostrato in precedenti lavori, l'espressione dell'oncoproteina E5 del BPV ed il suo legame fisico col PDGF β -r rappresentano il primo step della cancerogenesi uroteliale spontanea del bovino (Borzacchiello et al., 2003;2006).

Tuttavia, i pathways di trasduzione del segnale a valle dell'interazione E5- PDGF β -r erano ancora in larga parte sconosciuti. In questo lavoro si dimostra che il p-PDGF β -r attiva il pathway PI3K-AKT e che alcuni segnali mitogeni associati alla cancerogenesi: p-JUN e p-JNK sono iperespressi nel cancro della vescica urinaria. I risultati da noi ottenuti ci inducono ad ipotizzare che l'elevata attivazione dei segnali di proliferazione cellulare siano trasdotti dall'interazione dell'oncoproteina virale E5 con il p-PDGF β -r. Questi dati sono in accordo con precedenti studi condotti in vitro (Petti et al.,

2008) ed un recente lavoro del gruppo di ricerca del Prof. Borzacchiello condotto sui sarcoidi equini (Borzacchiello et al., 2009). Inoltre, giacchè diversi studi dimostrano che anche l'oncoproteina E5 dell'HPV segnala via PI3K-AKT (Zhang et al., 2002), supponiamo che questa possa essere una via di trasduzione del segnale comune alla cancerogenesi papillomavirus-indotta.

Questo studio apre un nuovo scenario per la comprensione dei meccanismi eziopatogenetici alla base dei tumori della vescica urinaria del bovino. Inoltre, i dati ottenuti confermano che questo modello animale di neoplasia è ancora di rilevante utilità per lo studio in vivo dei meccanismi molecolari alla base della cancerogenesi indotta dall'oncoproteina E5.

Ringraziamenti

Gli autori ringraziano il Sigr. Paolo Muzj (Dipartimento di Scienze cliniche veterinarie) per l'assistenza tecnica.

BIBLIOGRAFIA

Borzacchiello G., Iovane G., Marcante M.L., Poggiali F., Roperto F., Roperto S., Venuti A. Presence of bovine papillomavirus type 2 DNA and expression of the viral oncoprotein E5 in naturally occurring urinary bladder tumours in cows. (2003) *J. Gen. Virol.* 84, 2921-2926.

Borzacchiello G., Russo V., Gentile F., Roperto F., Venuti A., Nitsch L., Campo M.S., Roperto S. (2006). Bovine papillomavirus E5 oncoprotein binds to the activated form of the platelet-derived growth factor β receptor in naturally occurring bovine urinary bladder tumours. *Oncogene*, 25,1251–1260.

Borzacchiello G., Russo V., Spoleto C., Roperto S., Balcos L., Rizzo C., Venuti A., Roperto F. (2007). Bovine papillomavirus type-2 DNA and expression of E5 and E7 oncoproteins in vascular

tumours of the urinary bladder in cattle. *Cancer Letters*, 250, 82-91.

Borzacchiello G. e Roperto F. (2008). Bovine papillomaviruses, papillomas and cancer in cattle. *Veterinary Research* 39, 45.

Borzacchiello G., Mogavero S., De Vita G., Roperto S., Della Salda L., Roperto F. (2009) Activated Platelet-Derived Growth Factor β Receptor Expression, PI3K-AKT Pathway Molecular Analysis, and Transforming Signals in Equine Sarcoids. *Vet Pathol* 46 DOI: 10.1354/vp.08-VP-0191-B-FL

Campo M.S., Jarrett W.F., Barron R., O'Neil B.W. Smith K.T., (1992). Association of bovine papillomavirus type 2 and bracken fern with bladder cancer in cattle. *Cancer Research* 52, 6898-6904.

Cantley L.C., Neel B.G. (1999). New insights into tumour suppression: PTEN suppresses tumour formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 4240–4245.

Davis R.J. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. (2000) *Cell* 103, 239–252

Kim A.H., Yano H., Cho H., Meyer D., Monks B., Margolis B., Birnaub M.J., Chao M.V. AKT-1 regulates a JNK scaffold during excitotoxic apoptosis. (2002) *Neuron* 35, 697–709.

Petti L.M., Ricciardi E.C., Page H.J., Porte K.A. (2008). Transforming signals resulting from sustained activation of the PDGF β receptor in mortal human fibroblasts *J Cell Science* 8, 1172-1176.

Zhang B., Spandau D.F., Roman A. (2002). E5 Protein of Human Papillomavirus Type 16 Protects Human Foreskin Keratinocytes from UV B-Irradiation-Induced Apoptosis. *J. Virol.* 76, 220-231.

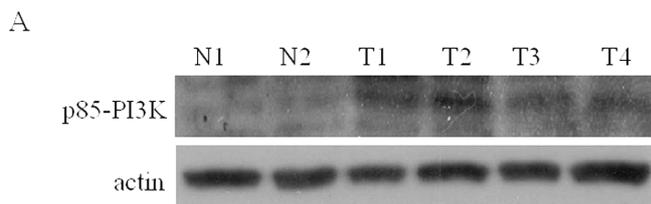


Fig. 1. (A) Campioni omogenizzati di 4 carcinomi uroteliali (T) and di 2 mucose normali (N). I livelli di espressione di p85-PI3K sono stati analizzati mediante western blotting. p85-PI3K è più espressa nei campioni di tumore in confronto alle mucose normali. La membrana è stata strippata ed ibridata con l'anticorpo anti-actina per normalizzare i campioni corsi sul gel (lower blot). (B) I campioni mostrati in (A) sono stati immunoprecipitati con l'anticorpo anti-p-PDGFR ed analizzati mediante western blotting con l'anticorpo anti p85-PI3K. p-PDGFR and p85-PI3K coprecipitano nei carcinomi uroteliali.

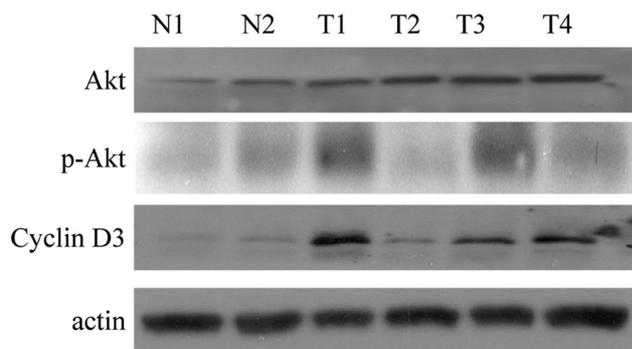
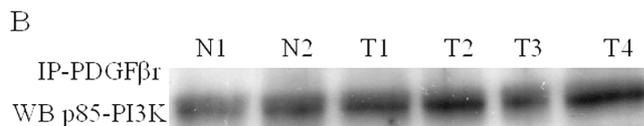


Fig. 2. Analisi mediante Western blotting dell'espressione delle proteine AKT, p-AKT e Cyclin D3 in carcinomi uroteliali (T) e mucose normali (N). La membrana è stata strippata e reibridata con un anticorpo anti-actina (lower blot). AKT e Cyclin D3 sono overesprese nei campioni di carcinoma rispetto al normale. Un aumento dei livelli di p-AKT si mostra nei campioni T1 and T3.

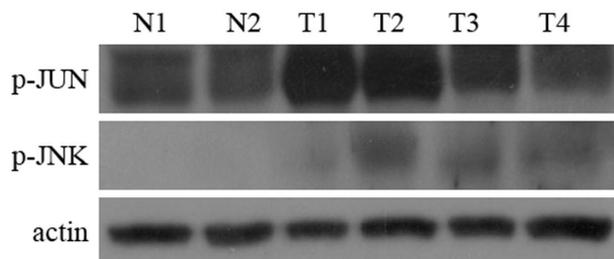


Fig. 3. Analisi dell'espressione di p-JNK and p-JUN mediante western blotting. Entrambe le fosfoproteine sono maggiormente espresse nei tumori rispetto ai campioni normali.

MOLECULAR PATHWAYS IN BOVINE PAPILLOMAVIRUS INDUCED UROTHELIAL CARCINOGENESIS

Bovine urinary bladder tumours are caused by the synergism among BPV-2 and some oncogenic principles from Bracken fern (*Pteridium aquilinum*). Mechanisms underlying cell transformation due to BPV oncogenes E5 and E7 are still largely unknown. Recently, it has been shown that E5 physically binds to the PDGFR inducing receptor activation. This mechanism (virocrine transformation) is considered to be the first step of BPV induced carcinogenesis. The aim of the present study was to investigate the molecular pathways underlying PDGFR activation. Bovine urinary bladder tumours as well as normal bladder samples were investigated by co-immunoprecipitation and western blotting in order to evaluate: 1) the expression of phosphorylated PDGFR (p-PDGFR); 2) the physical binding of p-PDGFR with the p85-PI3K; 3) the activation of the PI3K-Akt-cyclin D3 pathway; 4) phospho-JUN (p-JUN) and phospho JNK (p-JNK) expression. Our data show that during BPV spontaneous urothelial carcinogenesis the phosphorylation status of PDGFR is higher in cancer compared to normal and that the p-PDGFR



phiscally binds to the p85-PI3K, thus activating the PI3K-Akt-cyclin D3 pathway. Particularly, Akt and cyclin D3 are overexpressed and phosphorylation status of p-Akt,p-Jun and p-JNK is higher in cancer versus normal. These results may lead to hypothesize that the higher levels of transforming signals in bladder tumours are induced by the E5- PDGF β -R physical binding. Our study open a new scenario to further understand the etiopathogenetic mechanisms underlying bovine urinary bladder tumours.

Key words: urinary bladder tumours, Bovine papillomavirus, PDGF β -R, signal transduction

ESPRESSIONE DI MHC CLASSE I E II E CARATTERIZZAZIONE DELL'INFILTRATO INFIAMMATORIO NEI CARCINOMI DELLA VESCICA DEL BOVINO ASSOCIATI A BPV-2

Russo V.¹, Roperto S.², Paciello O.¹, Roperto F.¹

Dipartimento di Patologia e Sanità animale, ¹Settore di Patologia Generale, ²Settore di Malattie Infettive. Facoltà di Medicina Veterinaria di Napoli. Università degli Studi di Napoli Federico II

I tumori della vescica del bovino riconoscono una eziologia multifattoriale, caratterizzata dall'azione sinergica di infezioni virali (Bovine Papillomavirus tipo 2), infezioni batteriche e sostanze tossiche di origine vegetale.

Importanza sempre più rilevante si attribuisce al processo infiammatorio cronico come evento-chiave nella promozione del tumore. Si ipotizza, infatti, che l'infiammazione cronica sostenuta principalmente da virus possa essere responsabile della promozione del tumore attraverso meccanismi nei quali un ruolo centrale viene svolto da processi immunitari.

E' molto frequente il riscontro, nei tumori uroteliali del bovino, di focolai infiammatori a carico della parete dell' organo.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di studiare la distribuzione e la gravità dell'infiltrato infiammatorio, di caratterizzare fenotipicamente le diverse sottopopolazioni linfocitarie, e l'espressione del complesso maggiore di istocompatibilità di classe I e II in tumori vescicali BPV-2 indotti.

Le cellule infiammatorie avevano una distribuzione, focale, multifocale e diffusa ed erano localizzate prevalentemente alla periferia del tumore ed a volte tra le cellule neoplastiche. Le cellule infiammatorie erano prevalentemente CD45⁺ con la maggior parte di essi CD4⁺ e CD8⁺.

L'espressione dell'MHC di classe I e II era costante sulle cellule infiammatorie, mentre sulle cellule carcinomatose variava da caso a caso, con qualche campione che mostrava una completa assenza dell'espressione, altre con un'espressione eterogenea e altri ancora con una espressione alquanto omogenea del segnale.

I risultati, anche se preliminari, di questo studio indicano che l'infiltrato infiammatorio è rappresentato prevalentemente da CD45⁺, CD4⁺ e CD8⁺ e che i meccanismi immunologici coinvolti nella patogenesi del carcinoma uroteliale BPV-2 associato, includono sia l'MHC di classe I che l'MHC di classe II.

Parole chiave: papillomavirus bovino tipo 2, infiammazione, MHC di classe I e II

EXPRESSION OF MHC CLASS I AND II AND CHARACTERIZATION OF INFLAMMATORY CELLS IN BOVINE URINARY BLADDER CARCINOMA ASSOCIATED TO BPV-2

Tumours of the urinary bladder are very common in cattle grazing on lands containing a large amount of bracken fern (*Pteridium spp.*).

Bracken contains numerous toxic principles, some of them are responsible for inflammation (Braxin A, B, C); a power sesquiterpenoid, called ptaquiloside (PT), is believed to be the mayor carcinogen of the bracken fern. It has been suggested that chronic inflammation can be the key-event in promoting the tumour. In particular, chronic inflammation seems to be essential to promote tumour progression via immunologic processes involving both innate and adaptive immunity.

In this study we analyze the lymphocytes population and the expression of MHC class I and II in urinary bladder carcinomas associated to BPV-2 infection.

The results demonstrate that the inflammation is moderate to severe, with large amount of lymphocytes in the periphery of the tumours. The lymphocytes are CD45⁺, CD4⁺ and CD8⁺. Inflammation cells show prominent MHC class I and II immunoreactivity and variable expression of MHC class I and II in urothelial neoplastic cells is also evident.

These preliminary results suggest that: the inflammatory cells are prevalently CD45⁺, CD4⁺ and CD8⁺ and that the immune mechanisms participating in the pathogenesis of urinary bladder carcinoma associated to BPV-2 include MHC class I and II.

Key words: papillomavirus bovine type 2, inflammation, MHC class I and II

RISPOSTE CELLULARI DI LEUCOCITI FELINI INCUBATI CON PEPTIDI IMMUNOGENI DI CORONAVIRUS FELINO (FCoV)

Rossi Gabriele¹, Cornaro Claudia¹, Battilani Mara², Paltrinieri Saverio¹

¹*Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria – Sezione di Patologia Animale e Parassitologia – Università degli Studi di Milano.* ²*Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale - Alma Mater Studiorum - Università di Bologna*

La peritonite infettiva felina (FIP) è una patologia virale immunomediata e letale sostenuta da coronavirus felino (FCoV), la cui patogenesi sembra essere legata a depressione dell'immunità cellulo-mediata, la quale, invece, quando efficiente, può risultare protettiva. E' stato ipotizzato che il virus stesso sia in grado di indirizzare il tipo di risposta immunitaria. Per verificare tale ipotesi abbiamo valutato l'intensità della produzione di interferone γ (IFN- γ), citochina coinvolta nell'immunità cellulo-mediata, da parte di leucociti felini incubati in presenza di peptidi immunogeni di FCoV. Tali peptidi sono stati disegnati sulla base delle sequenze aminoacidiche della proteina N di ceppi di campo (virulenti e non) di FCoV, a livello dei residui 14 (2 diversi peptidi) 182 (3 peptidi) e 198 (3 peptidi). A tale scopo sono stati prelevati 16 campioni di sangue che sono stati suddivisi in aliquote, ognuna delle quali è stata incubata con i singoli peptidi o con soluzione fisiologica (controllo negativo). La produzione di IFN- γ è stata poi valutata nel plasma con un kit ELISA specifico. I peptidi disegnati sul residuo 14 e 182 ed il peptide disegnato sul residuo 198 di ceppi virulenti hanno indotto una diminuzione della produzione di IFN- γ ; il peptide derivato da sequenze del residuo 198 presenti sia in ceppi virulenti che avirulenti non ha modificato la produzione di IFN- γ rispetto al controllo negativo; il peptide disegnato sulle sequenze del residuo 198 di ceppi avirulenti ha indotto un aumento di produzione di IFN- γ . Tali risultati suggeriscono che alcune sequenze della proteina N di FCoV possono stimolare l'immunità cellulo-mediata, altre la deprimono, confermando l'ipotesi che lo stesso FCoV possa influenzare le risposte immunitarie del gatto.

Parole chiave: FCoV, IFN- γ , proteina N, immunità cellulo-mediata

INTRODUZIONE

La peritonite infettiva felina (FIP) è una patologia virale immunomediata letale sostenuta da coronavirus felino (FCoV). La patogenesi prevede un'infezione oro-fecale e la replicazione a livello apicale dei villi intestinali. Normalmente le infezioni da FCoV rimangono confinate a tale livello provocando solo manifestazioni cliniche locali imputabili alla deplezione dei villi intestinali. Il virus comunque replica esclusivamente negli enterociti e quindi l'infezione tende ad esaurirsi. Lo sviluppo della FIP è legato alla mutazione del ceppo enterico del FCoV che acquista la capacità di replicare all'interno dei macrofagi,¹ a seguito della quale l'ospite può generare due possibili risposte immunitarie: umorale e cellulo-mediata. Il gatto solitamente sviluppa una buona risposta anticorpale nei confronti del FCoV, ma la sede intra-macrofagica del virus la rende inefficace. Pertanto, in assenza di risposta cellulo-mediata l'infezione si protrae e il virus diffonde a livello sistemico. Una risposta prevalentemente umorale (mediata dai linfociti Th2) porta ad attivazione dei linfociti B con deposizione di complessi virus-anticorpo a livello endoteliale e conseguente sviluppo di vasculite piogranulomatosa da cui derivano i versamenti cavitari tipici della forma umida della FIP.

Se invece l'animale sviluppa un'efficace risposta cellulo-mediata (mediata dai linfociti Th1), l'infezione può divenire latente, il livello di viremia rimanere basso e si può sviluppare un certo grado di resistenza immunitaria. In questo tipo di risposta un ruolo chiave spetta all'interferone γ (INF γ), la principale citochina responsabile dell'immunità cellulo-mediata, che inibisce la proliferazione di cellule Th2 e stimola l'azione macrofagica e citotossica. Le lesioni piogranulomatose tipiche della forma secca sono riconducibili ad una risposta cellulo-mediata meno efficiente che portano alla continua liberazione, da parte dei macrofagi infetti, di particelle virali e citochine chemiotattiche che richiamano nel sito di lesione neutrofili e macrofagi conducendo così alla formazione dei tipici granulomi. Se a fronte di una efficace risposta cellulo-mediata si verificano eventi immunodepressanti i linfociti T possono spostare l'azione da quella prevalente Th1 a quella Th2 e quindi può comparire la forma umida.

L'elevata frequenza di mutazioni a cui può andare incontro il FCoV è attribuibile all'eccezionale

lunghezza dell'RNA virale (circa 29.000 nucleotidi) che comporta un elevato numero di mutazioni durante la replicazione virale che porta ad avere decine di varianti geneticamente diverse (quasispecie) all'interno dello stesso individuo.² Un'elevata frequenza di mutazione è stata riscontrata a livello dei geni 3c e 7b, ma l'ipotesi di un loro ruolo patogenetico è controversa.³ Quindi la mutazione del virus è solo uno degli eventi patogenetici responsabili dello sviluppo della FIP. La resistenza o la ricettività dell'animale alla FIP sembra possa anche dipendere dall'equilibrio tra risposta umorale e cellulo-mediata ed è stato ipotizzato che sia lo stesso virus a influenzare questa risposta. Recentemente, l'attenzione è stata posta verso la proteina N del FCoV che sembra sia in grado di stimolare l'immunità cellulo-mediata.

Sulla base di queste considerazioni abbiamo misurato l'intensità della produzione di IFN- γ da parte di leucociti felini incubati in presenza di peptidi immunogeni di FCoV. I peptidi utilizzati sono stati disegnati durante un precedente studio in collaborazione con la dottoressa Battilani⁴ partendo da sequenze della proteina N di ceppi di campo di FCoV, isolati sia da animali sani che patologici, che in seguito ad allineamento hanno mostrato la maggiore variabilità o caratterizzate da mutazioni in grado di differenziare i ceppi virulenti e avirulenti. In particolare sono state identificate tre regioni della proteina N corrispondenti ai residui 14, 182 e 198. Una volta identificate le sequenze, i peptidi (da due a tre per ogni residuo) sono stati disegnati partendo da epitopi potenzialmente in grado di stimolare l'immunità cellulo-mediata.

MATERIALI E METODI

Il lavoro è stato svolto su 16 campioni di sangue intero in EDTA prelevato da gatti sani, sui quali è stato effettuato un esame emocromocitometrico. Quando il volume di sangue lo consentiva, il campione è stato suddiviso in 9 aliquote (8 peptidi e un controllo) da 250 μ l poste ognuna in pozzetto di una piastra ELISA. Alle diverse aliquote sono stati aggiunti i peptidi in quantità tali da ottenere una concentrazione di 5 μ g/ml per campioni contenenti 1x10⁶ leucociti/ μ l. Al controllo negativo è stata aggiunta una quantità di soluzione fisiologica. La piastra è stata poi incubata a 37°C in camera umida in presenza del 5% di CO₂ per un'ora. Dopo tale periodo da ogni aliquota è stato

ottenuto il plasma mediante centrifugazione. La concentrazione plasmatica di IFN- γ è stata determinata mediante un kit ELISA presente in commercio (DuoSet® ELISA, R&D Systems Europe, Ltd.), già validato per l'utilizzo nel gatto.⁵ La densità ottica dei singoli pozzetti è stata quindi determinata usando un lettore di piastre settato a 450nm utilizzando un filtro a 540nm come lunghezza d'onda di riferimento.

RISULTATI

Il confronto tra concentrazione di IFN- γ nel plasma ($2,63 \pm 3,06$) e nel plasma dopo incubazione in assenza di IFN- γ (P_0 , $2,34 \pm 2,52$) ha dimostrato che l'incubazione porta ad una diminuzione significativa ($P=0,004$) della concentrazione di IFN- γ . I risultati dell'incubazione con peptidi sono riportati in tabella 1. Entrambi i peptidi disegnati sul residuo 14 inducono una diminuzione della produzione di IFN- γ rispetto a P_0 , vicino alla significatività statistica per il primo peptide e significativa per il secondo. Non è stata rilevata una differenza significativa tra i due peptidi nell'indurre tale diminuzione. L'incubazione con i tre peptidi disegnati sul residuo 182 ha indotto una diminuzione della produzione di IFN- γ , significativa per quanto riguarda P_4 ma anche in questo caso senza differenze significative tra i tre peptidi. Per quanto riguarda i tre peptidi disegnati sul residuo 198, pur in assenza di significatività statistica, l'incubazione con il P_6 ha indotto una diminuzione della produzione di IFN- γ , P_7 ha invece indotto un aumento della produzione di IFN particolarmente intenso in 3 gatti su 5, mentre P_8 è risultato caratterizzato da un'elevata variabilità individuale: in metà dei soggetti ha indotto una diminuzione della produzione di IFN, mentre nella restante metà non sono state rilevate differenze di alcun tipo.

DISCUSSIONE

Sebbene spesso non siano state evidenziate significatività statistiche, probabilmente a causa della bassa numerosità delle osservazioni e di un certo grado di variabilità (in gran parte imputabile ad un singolo soggetto), sono spesso state osservate notevoli differenze tra i campioni incubati con e senza peptidi. In linea generale, entrambi i peptidi del residuo 14 ed i tre del residuo 182 sono in grado di deprimere la produzione di IFN- γ senza però differenze significative in termini di entità di diminuzione.

Quindi si può ipotizzare che questi residui proteici, indipendentemente dal tipo di sequenza presente, determinino un certo grado di "immunodepressione" della risposta cellulomediata e quindi possano essere coinvolti nella suscettibilità alla FIP. L'assenza di differenze significative tra i peptidi fa presupporre che nessuno di essi sia più coinvolto dell'altro in questa suscettibilità.

I peptidi disegnati sul residuo 198 presentano le maggiori differenze: solo la sequenza riscontrata su ceppi virulenti ha portato ad una diminuzione paragonabile ai precedenti peptidi e quindi si ritiene possa influenzare lo spostamento della risposta da Th1 a Th2 tipico degli animali con FIP. Il peptide disegnato sulle sequenze isolate dai ceppi avirulenti ha indotto un aumento della produzione di IFN- γ e potrebbe quindi essere in grado di conferire un certo grado di resistenza alla FIP stimolando proprio una risposta di tipo Th1. L'ultimo peptide (disegnato su sequenze isolate sia da animali sani che patologici) ha evidenziato un comportamento molto diverso nei gatti presi in esame.

CONCLUSIONI

Tutti i peptidi disegnati sulle sequenze dei residui 14 e 182 e uno dei peptidi del residuo 198 sono potenzialmente coinvolti nella patogenesi della FIP, deprimendo l'immunità cellulomediata e favorendo quella umorale. Viceversa il P_7 del residuo 198 sembra che sia in grado di stimolare la risposta cellulomediata conferendo all'animale un certo grado di resistenza alla FIP. Se tale riscontro fosse confermato in vivo indicherebbe che la presenza di questi residui tende a favorire la comparsa della FIP. Questo lavoro conferma quindi che lo sviluppo della FIP non dipende solo dal ceppo virale o dalla risposta immunitaria dell'ospite, ma dall'interazione tra questi due fattori. La presenza di ceppi provvisti di particolari epitopi in grado di interagire con il sistema immunitario può indurre risposte protettive o al contrario facilitare la patogenesi della FIP.

BIBLIOGRAFIA

1. Vennema H. et al. Feline infectious peritonitis viruses arise by mutation from endemic feline enteric coronaviruses. *Virology* 243, 150-157; 1998
2. Herrewegh AAPM et al. Persistence and evolution of feline coronavirus in a closed cat breeding colony. *Virology* 234, 349-363; 1997

3. Kennedy MA et al. Analysis of genetic mutations in the 7a7b open reading frame of coronavirus of cheetahs (*Acinonyx jubatus*). *American Journal of Veterinary Research* 67(4), 627-632; 2006

4. Battilani M. et al. Structural and antigenic analysis of N protein of feline coronavirus (FCoV). 1st International conference Emerging

and re-Emerging viral diseases of the tropics and sub-tropics. New Dehli, 11-14 December 2007. Published in: *Indian Journal of Virology* 19(1); 2008

5. Giordano A et al. Interferon γ in the serum and effusion of cats with feline coronavirus infection. *The Veterinary Journal* 180, 396-398; 2009

Peptidi	Valori basali (P ₀)	[IFN- γ] dopo stimolazione	Significatività
P ₁ (virulenti e avirulenti) N = 10	3,5 ± 2,5	2,49 ± 1,85	P=0,08
P ₂ (avirulenti) N= 10	2,54 ± 1,9	1,21 ± 0,87	P=0,048
P ₃ (virulenti e avirulenti) N = 10	3,48 ± 2,52	1,8 ± 1,95	P=0,162
P ₄ (virulenti) N = 9	4,14 ± 2,56	1,3 ± 1,39	P=0,019
P ₅ (avirulenti) N = 9	3,86 ± 2,36	1,38 ± 2,71	P=0,164
P ₆ (virulenti) N = 9	2,64 ± 1,99	0,83 ± 0,96	P=0,097
P ₇ (avirulenti) N = 5	3,23 ± 2,29	5,15 ± 5,01	P=0,437
P ₈ (virulenti e avirulenti) N = 7	3,77 ± 2,72	1,41 ± 2,51	P=0,218

Tabella 1. Concentrazione media di IFN- γ prima e dopo incubazione con i peptidi

CELLULAR RESPONSES OF FELINE LEUKOCYTES INCUBATED WITH IMMUNOGENIC PEPTIDES OF THE FELINE CORONAVIRUS (FCoV)

Feline infectious peritonitis (FIP) is a viral fatal immune-mediated disease due to the feline coronavirus (FCoV). Cats with FIP have a decreased cell-mediated immunity, while non-symptomatic FCoV infected cats have a strong cell-mediated immunity. It has been hypothesized that the virus itself could influence host's immune responses. To test this hypothesis, we assessed the production of interferon γ (IFN- γ), a cytokine involved in cell-mediated responses, by feline leucocytes incubated with immunogenic peptides of FCoVs. These peptides have been designed on the basis of aminoacid sequences of N protein of virulent or avirulent strains of the FCoVs, on residues 14 (2 different peptides), 182 (3 peptides) and 198 (3 peptides). Sixteen feline whole blood samples were collected and aliquoted. Each aliquot was incubated with each single peptide or with saline solution (negative control). IFN- γ was then measured in plasma using a specific ELISA kit. All the peptides from the residue 14 and 182 and the peptide designed on the sequence of the residue 198 of virulent strains decreased the production of IFN- γ ; the peptide detected on the residue 198 of both virulent and avirulent strains did not alter the IFN- γ production compared to negative controls; the peptide detected on the residue 198 of avirulent strains increased the production of IFN- γ . These results suggest that some sequences of FCoV protein N can stimulate and others can depress cell-mediated immunity. This confirms that the FCoV itself can influence the immune responses of the feline host.

Key words: FCoV, IFN- γ , N protein, cell mediated immunity

CONFRONTO TRA TEST DIAGNOSTICI IN CASI ATIPICI DI "SOSPETTA PERITONITE INFETTIVA FELINA"

Giori Luca, Giordano Alessia, Giudice Chiara, Grieco Valeria, Paltrinieri Saverio

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

La diagnosi di peritonite infettiva felina (FIP) è semplice nelle forme umide, sulla base di analisi del versamento ed elettroforesi, o in forme secche caratterizzate da aumenti sierici della AGP (glicoproteina acida). Il *gold standard* è comunque l'istologia. In questo studio abbiamo valutato retrospettivamente i dati di 12 gatti che presentavano esiti dubbi in vivo e/o *post-mortem*, nei quali la diagnosi di FIP è stata esclusa in base al follow-up o confermata con immunocistochemica (IHC) per coronavirus felino (FCoV), per valutare quale test mostrasse migliore sensibilità, specificità e concordanza con l'IHC.

Negli 8 gatti positivi per FCoV sono risultati non compatibili con FIP o dubbi: quadro clinico (3 casi su 8), ematologia (7/7), esame del versamento (3/6), elettroforesi (5/8), sierologia o PCR (4/5), necropsia/istologia (5/8). Al contrario solo la AGP è sempre risultata elevata (8/8). I 4 gatti non affetti da FIP sulla base di IHC negativa (n=2) o completa remissione clinica (n=2) avevano quadro clinico, versamento e, in 2 casi, anche sierologia o elettroforesi compatibili con l'IP. Istologia e AGP sono risultati non compatibili in tutti i gatti testati. Tali dati mostrano che la concordanza con la IHC è stata assoluta solo per la AGP (k=1.00), bassa per l'istologia (k=0.19) e nulla per gli altri test (k<0.00). Nonostante la bassa concordanza, l'istologia ha mostrato elevata specificità (100%), al contrario dell'analisi del versamento (0%). Solo l'IHC può quindi essere considerata il *gold standard* per FIP e dovrebbe essere eseguita in ogni caso dubbio. Se ciò non fosse possibile, un esito istologico dubbio può essere considerato compatibile con FIP in caso di elevata AGP, unico test dimostratosi accurato.

Parole chiave: FIP, AGP, immunocistochemica, diagnosi

INTRODUZIONE

La peritonite infettiva felina (FIP) è una malattia virale sostenuta dal *Feline Infectious Peritonitis Virus* (FIPV), che deriva dal *Feline Enteric Coronavirus* (FECV) in seguito a mutazioni e con il quale costituisce un'unica entità definita *Feline Coronavirus* (FCoV).⁵ FIPV e FECV sono identici per genoma e corredo antigenico ma differiscono tra loro per patogenicità e tropismo cellulare: il FECV colpisce gli enterociti e determina lieve sintomatologia enterica, mentre il FIPV infetta i monociti-macrofagi che lo distribuiscono nell'organismo, evento chiave nella patogenesi della FIP.⁴ Resistenza o recettività alla malattia dipendono poi dall'equilibrio tra immunità umorale e cellulo-mediata.⁴

Il sospetto di FIP può essere emesso grazie a dati anamnestici, clinici e di laboratorio, ma nessuno di questi elementi, da solo, può confermare la diagnosi *antemortem* di FIP.¹ Alcuni di essi hanno però elevata predittività. In particolare, la presenza di versamenti di aspetto filante, ad alto peso specifico, ricchi di proteine e γ -globuline e citologicamente composti da granulociti neutrofilici non degenerati, linfociti e macrofagi su un fondo eosinofilo proteinaceo, e la presenza di alterazioni elettroforetiche quali aumento di proteine totali, α e γ globuline, rendono il sospetto diagnostico di FIP molto attendibile. Recentemente la misurazione dell'AGP (α 1glicoproteina acida) è stata consigliata come test di conferma diagnostica dal momento che secondo l'approccio probabilistico di Bayes bastano valori modicamente elevati per confermare la diagnosi nei gatti con forte sospetto clinico di FIP.³ Tra i test con valore diagnostico trascurabile si collocano invece la sierologia e la PCR (Polymerase Chain Reaction), che dimostrano solo la presenza di FCoV, frequente in gatti di allevamento dove sono continue le re-infezioni da ceppi enterici, ma non identificano il virus mutato.¹ I gatti malati possono addirittura risultare sieronegativi dal momento che anticorpi e virus vengono "sequestrati" nelle lesioni.

Nell'ambito della nostra attività di ricerca abbiamo riscontrato una serie di casi atipici con quadri dubbi in vivo e/o post-mortem. Obiettivo del nostro lavoro è stato quello di valutare quale test *in vivo* mostrasse migliore sensibilità, specificità e concordanza con la diagnosi finale, in modo da fornire all'anatomopatologo un strumento pratico per meglio inquadrare i casi

istologicamente dubbi verso una diagnosi di "FIP" o "NON FIP".

MATERIALI E METODI

Tra i diversi casi atipici che sono stati posti alla nostra attenzione, abbiamo valutato retrospettivamente i dati dei 12 gatti in cui la diagnosi di FIP è stata esclusa o confermata in base rispettivamente al follow-up o alla positività immunostocchimica (IHC) per FCoV.

Dei 12 casi esaminati, 4 presentavano sintomi compatibili con FIP quali uveite (gatto n° 1) o versamento addominale citologicamente compatibile (gatti 2, 3 e 4) e in alcuni casi provenivano da allevamenti endemici per FCoV, ma non erano affetti da FIP in quanto guariti dopo terapie specifiche (gatti 1 e 3) o caratterizzati da lesioni post-mortali non riferibili a FIP (ernia diaframmatica nel gatto 2 e neoplasia epatica nel gatto 4).

In 8 gatti, invece, la diagnosi di FIP è stata confermata dall'IHC: 4 di tali soggetti avevano presentazioni cliniche atipiche, tra le quali: assenza di sintomi compatibili (gatto n° 9, che presentava solo stentata crescita), una formazione cistica intratoracica (gatto n° 11), una sindrome emorragica con versamento povero di cellule e proteine (gatto n° 7), una massa mediastinica citologicamente compatibile con linfoma (gatto n° 6); gli altri 4, nonostante aspetti parzialmente compatibili con FIP *in vivo*, i quadri necroscopici o istologici erano compatibili non solo con FIP ma anche con altre patologie quali una micosi intestinale (gatto n° 8), linfadenopatia mesenterica (gatti n° 5 e 12), fibrosi intestinale (gatto n° 10).

Una volta categorizzati anamnesi, presentazione clinica e risultati dei test come *compatibili, dubbi o non compatibili* con FIP (Tabella 1), i dati relativi ai soggetti con e senza FIP sono stati utilizzati per classificare i gatti come veri positivi (VP), falsi positivi (FP), veri negativi (VN) e falsi negativi (FN). Sulla base di tali valori sono stati calcolati sensibilità ($\text{sens} = (\text{VP}/(\text{VP}+\text{FN})) \cdot 100$) e specificità ($\text{spec} = (\text{VN}/(\text{VN}+\text{FP})) \cdot 100$) dei diversi test, nonché il rapporto di verosimiglianza (*likelihood ratio*) positivo ($\text{sens}/(1-\text{spec})$) e negativo ($(1-\text{sens})/\text{spec}$) ed è stata calcolata la concordanza dei diversi risultati con la diagnosi finale mediante determinazione del coefficiente kappa di Cohen e successiva classificazione in classi di concordanza secondo Landis e Koch.²

RISULTATI

I risultati ottenuti nei 12 gatti sono riassunti in Tabella 2, mentre quelli relativi a sensibilità, specificità e concordanza sono riportati in Tabella 3.

Valutando i risultati nel complesso si può osservare che i 4 gatti senza FIP presentavano quadro clinico, versamento e, in 2 casi, anche sierologia o elettroforesi compatibili con FIP. Istologia e AGP sono risultati non compatibili in tutti i gatti testati. Negli 8 gatti con FIP sono risultati non compatibili o dubbi: quadro clinico (3 casi su 8), ematologia (7/7), esame del versamento (3/6), elettroforesi (5/8), sierologia o PCR (4/5), necropsia/istologia (5/8). Al contrario solo la AGP è sempre risultata elevata (8/8). Il test K di Cohen mostra che la concordanza con la IHC è stata assoluta solo per la AGP ($k=1.00$), bassa per l'istologia ($k=0.19$) e nulla per gli altri test ($k<0.00$). Nonostante la bassa concordanza, l'istologia ha mostrato elevata specificità (100%), al contrario dell'analisi del versamento (0%).

DISCUSSIONE

I risultati da noi ottenuti dimostrano che la diagnosi *in vivo* di FIP può non essere facile. A parte l'esame biptico (spesso sconsigliato per le condizioni scadenti degli animali) ed immunostochimico (*gold standard*), non esistono test in grado di confermare un sospetto clinico di FIP: non ci si può quindi fermare alla presentazione clinica e alla anamnesi, anche quando queste risultino molto compatibili (caso 1), o completamente fuorvianti come nei casi 6, 7, 9 e 11. Anche l'aspetto dei versamenti non è sempre patognomnico: la presenza di un essudato ricco di neutrofili non degenerati, macrofagi, rari linfociti e cellule mesoteliali così come il precipitato proteico espressione di alte quote di fibrinogeno possono essere osservati anche in altre patologie a componente infiammatoria o reattiva, come è accaduto nei casi 2, 3 e 4. L'esame citologico è comunque utile se può fornire indicazioni sulla presenza di patologie diverse dalla FIP (es: il riscontro di cellule tumorali, o di neutrofili degenerati in fagocitosi batterica indirizza la diagnosi rispettivamente verso una neoplasia o un pitorace).

E' comunemente accettato che la diagnosi di FIP deve basarsi sulla presenza di quadri biptici che evidenzino polisierosite fibrinosa, infiltrazione di

cellule mononucleate, focolai parenchimali piogranulomatosi, e/o necrotico proliferativi.¹ Il riscontro di quadri necroscopici "classici" risulta quasi sempre risolutivo dal momento che nella quasi totalità dei casi (97%) si riscontrano lesioni patognomoniche. In letteratura, però, non sono disponibili informazioni su come valutare i casi in cui anche l'istologia non risulti risolutiva, come osservato nei casi 5, 8, 10 e 12.

Nella nostra casistica, seppur limitata, l'AGP si è dimostrata l'unico test con concordanza diagnostica assoluta ($K = 1,00$). La bassa concordanza dell'istologia è prevalentemente dovuta alla sua bassa sensibilità, a fronte di una specificità assoluta: in termini pratici ciò conferma che il riscontro di lesioni chiaramente compatibili con FIP è diagnostico per questa patologia ma se le lesioni sono dubbie o assenti la FIP non può essere esclusa, come dimostrato anche dal valore di LR-, abbastanza lontano dallo 0,00 (valore che indica la probabilità nulla di FIP). Al contrario la citologia del versamento, ritenuta molto specifica (caratterizzata da pochi falsi positivi), non lo è stata per nulla nella nostra casistica, per il motivo sopra ipotizzato, e anche in termini di verosimiglianza diagnostica il valore ottenuto è stato molto basso, se si considera che la probabilità diagnostica post-test aumenta solo se la LR+ è molto superiore ad 1,00.

CONCLUSIONE

La presenza di lesioni istologiche compatibili con FIP è risolutiva in casi a presentazione clinica atipica. In assenza di lesioni chiaramente riferibili a FIP solo l'IHC può fungere da *gold standard* per FIP e dovrebbe essere sempre eseguita. Se ciò non fosse possibile, un esito necroscopico o istologico dubbio non può essere considerato compatibile con FIP solo sulla base della presenza di una citologia del versamento compatibile con FIP, ma solo in caso di elevata AGP, unico test dimostratosi accurato.

BIBLIOGRAFIA

1. Addie D. D., Paltrinieri S., Pedersen N. C.: "Recommendations from workshops of the second international feline coronavirus/feline infectious peritonitis symposium". *Journal of Feline Medicine and Surgery* 6: 125-130, 2004
2. Landis J.R. and Koch G. G.: "The measurement of observer agreement for

- categorical data" *Biometrics* 33: 159-174, 1977
3. Paltrinieri S., Giordano A., Tranquillo V., Guazzetti S.: "Critical assessment of the diagnostic value of feline α 1- acid glycoprotein for feline infectious peritonitis using likelihood ratios approach". *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 29; 266-272, 2007
 4. Pedersen N. C.: "An overview of feline enteric coronavirus and infectious peritonitis virus infections". *Feline Practice* 23; 7-20, 1995
 5. Poland A. M., Vennema H., Foley J. E., Pedersen N. C.: "Two related strains of feline infectious peritonitis virus isolated from immunocompromised cats infected with feline enteric coronavirus". *Journal of Clinical Microbiology* 34: 3180-3184, 1996

Tabella 1. Categorizzazione dei parametri diagnostici compatibili, dubbi e non compatibili con FIP.

	Anamnesi	Sintomi	Versamento	Elettroforesi	AGP mg/ml
Compatibile C	Allevamento/ Colonie con precedenti casi di FIP o positività sierologica	Febbre, versamenti, lesioni oculari, ittero, masse, alterazioni SNC	Aspetto macroscopico e citologia compatibile	Iperprotidemia, aumento di \square_2 e \square , basso rapporto A/G	>1,5
Dubbio D	-	Masse o febbre o alterazioni SNC	Citologia compatibile	Solo una o poche alterazioni elettroforetiche	Tra 0,5 e 1,5
Non compatibile NC	Gatti di privati mai venuti a contatto con gatti FCoV positivi	nessuno dei reperti sopra citati	Aspetto macroscopico e citologia non compatibili	Elettroforesi normale	< 0,5

Tabella 2. Classificazione dei casi in funzione dei risultati ottenuti

Gruppo	Campione	Anamnesi/sintomi	Versamento	SPE	AGP	Sierol/PCR	Necro/isto
NON FIP	1	C	--	NC	NC	--	--
	2	C	C	C	NC	NC	NC
	3	C	D	C	NC	NC	C
	4	NC	C	C	C	NC	NC
FIP	5	C	NC	NC	C	--	D
	6	NC	--	C	C	--	D
	7	C	NC	D	C	NC	D
	8	D	C	C	NC	C	C
	9	C	NC	C	C	C	NC
	10	C	NC	NC	C	--	C
	11	C	C	C	C	C	NC
	12	C	D	--	NC	C	NC

Legenda: C = compatibile; D = dubbio; NC = non compatibile.

Tabella 3. Coefficiente K, sensibilità, specificità, LR+ e LR-

	Anamnesi/sintomi	Versamento	Elettroforesi	AGP	Sierol/PCR	Necro/isto
Coeff k (95% CI)*	-0.4 (0.61/-0.53)	-0.52 (-0.99/-0.05)	0.25 (-0.07/0.55)	1.00 (1.00/1.00)	-0.08 (-0.71/0.55)	0.09 (-0.11/0.29)
Sens	62,5%	50%	37.5%	100%		37.5%
Spec	0%	0%	50%	100%		100%
LR+	0,63	0,50	0.75	-		-
LR-	-	-	1.25	0,00		0.63

Legenda: CI = Confidential Interval; sens = sensibilità; spec = specificità; LH+ = likelihood ratio positivo; LH- = likelihood ratio negativo

COMPARISON OF DIAGNOSTIC TESTS IN ATYPICAL CASES OF "SUSPECTED FELINE INFECTIOUS PERITONITIS"

The diagnosis of feline infectious peritonitis (FIP) is easy in wet forms, based on serum protein electrophoresis (SPE) or on the analysis of effusions, or in dry forms with high levels of serum AGP (acid glycoprotein). Histology is considered the *gold standard* test. In this study we retrospectively evaluated data of 12 cats which had unclear results both *in vivo* and/or *post-mortem*, in which the diagnosis of FIP was

ruled out based on the follow-up or confirmed by immunohistochemistry (IHC) for the feline coronavirus (FCoV), in order to assess which test had the best sensitivity, specificity and concordance with IHC. The 8 cats with positive IHC, had doubt or non consistent with FIP clinical patterns (3/8 cases), haematology (7/7), analysis of the effusion (3/6), SPE (5/8), serology or PCR (4/5), necropsy/histology (5/8). AGP levels were always high (8/8). The 4 cats on which FIP was excluded based on negative IHC results (n=2) or clinical remission (n=2) had clinical patterns, effusions, and, in 2 cases, serology or SPE consistent with FIP. Histology and AGP were not consistent with FIP in all the cats tested. This demonstrates that the concordance with IHC was high only for AGP (k=1.00), low for histology (k=0.19) or absent for other tests (k<0.00). Despite this low concordance, histology showed specificity (100%) in contrast of the analysis of the effusions (0%). These results suggest that only IHC must be considered the *gold standard* test, and it should always be run in doubt cases. When this is not possible, doubtful histological results can be considered consistent with FIP only in the case of high AGP levels, which were the most accurate in vivo result.

Key words: FIP, AGP, immunohistochemistry, diagnosis

LE PROTEINE DI FASE ACUTA DELLO STAMBECCO (*CAPRA IBEX*) DURANTE INFESTAZIONE DA ROGNA SARCOPTICA (*SARCOPTES SCABIEI*)
ACUTE PHASE PROTEINS IN SERUM FROM ALPINE IBEX (*CAPRA IBEX*) WITH SARCOPTIC MANGE (*SARCOPTES SCABIEI*).

Rahman Mizan Md, Fraquelli Cristina, Sartorelli Paola, Lecchi Cristina, Cecilian Fabrizio

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

Le proteine di fase acuta costituiscono un gruppo di proteine, non correlate dal punto di vista strutturale, la cui concentrazione nel sangue viene modificata in corso di risposta sistemica alla infiammazione (fase acuta).

L'obiettivo di questo studio è stato la valutazione della concentrazione plasmatica delle quattro principali proteine di fase acuta nei ruminanti, la serum amyloid A (SAA), l'aptoglobina (Hp), la α_1 -acid glycoprotein (AGP) e la ceruloplasmina (Cp) in campioni provenienti da stambecchi sani, utilizzati come controllo, e da stambecchi affetti da rogna sarcoptica. A questi due gruppi ne è stato aggiunto un terzo, in cui sono stati compresi animali clinicamente sani ma presenti nella zona in cui era in corso l'infestazione di rogna.

Come prerequisito per questo studio è stata determinata la struttura primaria delle quattro proteine mediante sequenziamento del cDNA ottenuto da fegato.

Tutti gli animali che dimostravano una sintomatologia clinicamente manifesta ascrivibile a rogna hanno evidenziato un aumento della concentrazione plasmatica di tutte e quattro le proteine di fase acuta prese in considerazione in questo studio. Due di esse in particolare, la SAA e la AGP si sono comportate da *major acute phase proteins*, ovvero la loro concentrazione è aumentata di più di dieci volte rispetto ai controlli sani ($P < 0.001$). Le altre due proteine (Cp e Hp), benché aumentate, si sono comportate da *minor acute phase proteins*, dato che la loro concentrazione viene aumentata da due a cinque volte ($P < 0.001$).

Inoltre, la concentrazione plasmatica di SAA ed Hp è risultata aumentata in modo significativo ($P < 0.001$) anche in animali privi di sintomatologia clinica, ma presenti nell'area in cui era in corso l'epidemia di rogna. E' possibile quindi ipotizzare che queste due proteine possano essere utilizzabili come indicatori precoci di rogna sarcoptica in una fase in cui i sintomi clinici non sono ancora evidenti.

Parole chiave: stambecco, proteine di fase acuta, rogna sarcoptica

ACUTE PHASE PROTEINS IN SERUM FROM ALPINE IBEX (*CAPRA IBEX*) WITH SARCOPTIC MANGE (*SARCOPTES SCABIEI*)

Summary

The acute phase proteins are a group of serum proteins that change their concentration in animals following external or internal challenges, such as infection, inflammation or stress. The concentrations of four among them, including serum amyloid A (SAA), haptoglobin (Hp), α_1 -acid glycoprotein (AGP) and ceruloplasmin (Cp) were determined in serum collected from healthy ibexes (*Capra ibex*) and ibexes with *Sarcoptic scabiei* mange. A third group of animals was evaluated, including clinically healthy ibexes from area in which Sarcoptic mange had been reported. Primary structures of all four APP were determined by cDNA sequencing. The concentrations of all four APP were higher in serum of animals with clinical signs of Sarcoptic mange when compared to healthy animals. Two of the APP, including SAA and AGP acted as major APP, since their serum concentrations were increased more than ten folds when compared to healthy animals ($P < 0.001$). The other two APP, including Hp and Cp, acted as minor acute phase proteins, as they increase their concentration were increased from two to five folds ($P < 0.001$).

Remarkably, SAA and Hp are also raised in clinically healthy animals that live in infested areas suggesting that these two proteins might be indicators of early infection.

Key words: ibex, acute phase proteins, sarcoptica mange

RACTOPAMINA IDROCLORURO NEL SUINO IN FINISSAGGIO: CROSS-TALKING TRA SISTEMA ADRENERGICO, STEROIDEO E TIROIDEO

Catalano Deborah, Raimondi Silvia, Queliti Roberta, Amedeo Stefano, Bellino Claudio, Biasibetti Elena, D'Angelo Antonio, Perona Giovanni, Pollicino Paolo, Savarino Paolo, Tomassone Laura, Zanatta Renato, Odore Rosangela, Capucchio Maria Teresa

Università degli Studi di Torino, Dipartimento di Patologia Animale

La crescita degli animali in produzione zootecnica è influenzata da molti fattori. Un incremento può essere realizzato anche somministrando agli animali molecole che influenzano, direttamente o indirettamente, l'equilibrio ormonale. Ractopamina idrocloruro (RAC) è un β -agonista, il cui utilizzo è attualmente vietato in Europa, che agisce come agente di ripartizione favorendo lo sviluppo della massa muscolare magra. Al fine di sviluppare biomarcatori anatomo-istopatologici utili per rilevare l'uso di questa sostanza è stato allestito un gruppo sperimentale di 32 suini.

Gli animali, 16 femmine e 16 maschi, in fase di finissaggio, sono stati trattati per 5 settimane fino al raggiungimento di un peso di 140 Kg circa con una dieta standard integrata con diversi dosaggi di RAC (10, 20, 40 mg/kg/die [ppm]).

Al termine del trattamento gli animali sono stati sottoposti a prelievo di sangue, urina e liquor e sacrificati. N° 26 organi sono stati valutati macroscopicamente e stoccati per l'esecuzione di indagini istologiche, ultrastrutturali e biochimiche. L'unico reperto significativo alla valutazione macroscopica è stata la diminuzione di volume delle tiroidi.

Istologicamente interessanti reperti sono stati riscontrati a livello di uretra e prostata. In particolare quadri di iperplasia da minimi a moderati erano presenti a livello dell'epitelio uretrale e prostatico talora in associazione a fenomeni di metaplasia.

Disseminati infiltrati eosinofilici erano visibili negli organi linfoidi e intorno ai follicoli ovarici.

Le modificazioni osservate a carico delle tiroidi, delle uretre e delle prostate confermano l'esistenza di specifiche interazioni tra sistema adrenergico ed ormoni tiroidei e steroidei, il cui meccanismo resta da chiarire. Ulteriori studi sono necessari per conoscere le specifiche interazioni tra la RAC ed i recettori adrenergici e steroidei negli organi bersaglio dei suini trattati.

Ricerca supportata da fondi della Regione Piemonte (Ricerca Sanitaria Finalizzata 2006-2007) e dall'Università di Torino

Parole chiave: suini, ractopamina, patologia

RACTOPAMINE HYDROCHLORIDE IN FINISHING PIGS: CROSS-TALKING BETWEEN ADRENERGIC, STEROID AND THYROID SYSTEMS.

Ractopamine (RAC) is a beta agonist agent. RAC acts as a repartitioning agent, promoting lean tissue deposition. A preliminary study has been done to evaluate macroscopical and histological lesions on 26 organs in 32 pigs treated with standard finishing food plus 10, 20, 40 ppm RAC for 5 weeks.

Immediately after stunning tissues samples were collected to perform laboratory investigations. Preliminary data reported involvement of the thyroid, urethra and prostate confirming a cross-talking between adrenergic, thyroid and steroid systems.

The biochemical mechanism causing these findings remains unknown and further studies are needed to elucidate the specific interactions between RAC and hormonal receptors.

Key words: pigs, ractopamine, pathology

IMMUNITÀ CELLULO-MEDIATA IN CORSO DI VACCINAZIONE E INFEZIONE VIRALE NEL SUINO: TECNICHE E CRITERI DI VALUTAZIONE

Ferrari Luca, De Angelis Elena, Corradi Attilio, Martelli Paolo, Borghetti Paolo

Dipartimento di Salute Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Parma

Diverse tecniche per la valutazione dell'immunità cellulo-mediata sono applicate nel suino in corso di vaccinazione e infezione virale sperimentale o naturale. Poiché l'interazione virus-ospite è spesso complessa, tali indagini, pur avendo un approccio comune, devono essere valutate con opportuni criteri di analisi.

La citofluorimetria (FCM) può evidenziare cambiamenti nelle sottopopolazioni linfocitarie nel sangue ma senza indicare quelle specificamente reattive contro il virus; l'identificazione fenotipica può però essere associata alla marcatura intracellulare (ICS) di citochine, amplificando così l'informazione funzionale.

La tecnica ELISpot permette invece la quantificazione di cellule secernenti citochine virus-specifiche, è altamente sensibile, e quindi può essere sfruttata anche nei casi di ridotta stimolazione virale.

Nel presente studio, tali analisi sono state condotte in condizioni di campo, confrontando la risposta immunitaria cellulo-mediata in differenti condizioni di stimolo virale: vaccinazione per la Malattia di Aujeszky (AD) e per la sindrome riproduttiva e respiratoria del suino (PRRS), infezione naturale da PRRSV. Nella vaccinazione con ADV la FCM ha evidenziato modificazioni sistemiche nelle cellule CD4+CD8+, CD8+, CD25+ e CD8+IFN γ +; i livelli di cellule secernenti IFN γ ADV-specifiche sono stati quantificati finemente con la tecnica ELISpot e sono aumentati soprattutto dopo il *booster* vaccinale. Tutti gli animali hanno manifestato reattività e sono state identificate classi di responsività elevata. La ICS ha evidenziato un concomitante aumento di cellule CD8+IFN γ +.

La vaccinazione per PRRSV e la successiva infezione naturale hanno indotto modificazioni nei livelli di cellule NK, linfociti T citotossici e linfociti T γ/δ . La tecnica ELISpot ha evidenziato elevata eterogeneità di risposta, anche caratterizzata da animali scarsamente o non reattivi.

Si deduce quindi che spesso l'approccio combinato di diverse tecniche permette una valutazione più ampia e attendibile di come il sistema immunitario stia reagendo a un virus.

Parole chiave: suino, immunità cellulo-mediata, vaccinazione, infezione

CELL-MEDIATED IMMUNITY AFTER VACCINATION AND VIRAL INFECTION IN SWINE: TECHNIQUES AND EVALUATION CRITERIA

Several techniques for the evaluation of the cell-mediated immune response are applied in swine vaccination and experimental or natural viral infections. Since virus-host interaction is often complex, such techniques, despite of a common approach, have to be evaluated with proper analysis criteria.

Flow cytometry (FCM) can highlight changes in lymphocyte subsets in the blood but does not identify those virus-specific; however phenotypic detection can be associated with cytokine intracellular staining (ICS), thus amplifying functional information. The ELISpot assay allows quantification of virus-specific cytokine secreting cells, is highly sensitive and thus can be employed in poor virus immune stimulation.

In the present study, such analyses were performed under field conditions, comparing the cell-mediated immune response after different virus stimulation: ADV and PRRSV vaccination, PRRSV natural infection. After ADV vaccination FCM showed changes in peripheral CD4+CD8+, CD8+, CD25+ and CD8+IFN γ + cells; the levels of ADV-specific IFN γ secreting cells were accurately quantified by the ELISpot assay and augmented especially after booster vaccination. All the pigs were responsive and high responsiveness categories were identified. ICS showed a concomitant increase of CD8+IFN γ + cells.

PRRSV vaccination and natural infection induced changes in NK cells, cytotoxic and γ/δ T lymphocytes; the ELISpot assay showed high variation response, also characterized by poorly or non-responding pigs.

It is gathered that a combined approach often allows a wider and reliable evaluation of how the immune system is reacting against a virus.

Key words: swine, cell-mediated immunity, vaccination, infection

RISPOSTA CELLULO-MEDIATA, QUADRI ISTOPATOLOGICI E RUOLO PROTETTIVO DELLA VITAMINA E IN SUINI SPERIMENTALMENTE INTOSSICATI CON OCRATOSSINA A (OTA)

Jottini Stefano, Cantoni Anna Maria, De Angelis Elena, Ferrari Luca, Di Lecce Rosanna, Passeri Benedetta, Borghetti Paolo, Corradi Attilio

Sezione di Patologia Generale e Anatomia Patologica Veterinaria, Dipartimento di Salute Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Parma

L'obiettivo della ricerca è stato quello di valutare se il supplemento di vitamina E a un mangime contaminato da OTA, svolga un'azione protettivo-detossificante.

Ventiquattro suinetti di 28 giorni suddivisi in sei gruppi sono stati alimentati per 45 giorni con mangime non contaminato (CTRL), mangime non contaminato e addizionato di 4000 ppm di Vit. E (A), mangime contaminato con 180-200 ppb di OTA (B), mangime contaminato con 180-200 ppb di OTA e addizionato di 1000 ppm (C), 2000 ppm (D) 4000 ppm (E) di Vit. E. Su sangue sono stati eseguiti: caratterizzazione fenotipica delle sottopopolazioni linfocitarie T, test MTT, RT-PCR per citochine e determinazione di IgA, IgG, IgM sieriche; sugli animali sono stati condotti esame necroscopico e istopatologico.

L'analisi mediante RT-PCR ha mostrato un aumento di IL-6 e TNF- α nelle PBMC dei suini del gruppo B e C, rispetto ai gruppi CTRL e A. Nei gruppi D e E i valori di IL-6 e TNF- α si sono mostrati assimilabili a quelli dei gruppi CTRL e A. Con l'esame istologico si è osservato, negli organi linfoidi di tutti i suinetti esposti all'OTA, un aumento dei linfociti in apoptosi nella corticale del timo e dei centri germinativi dei noduli linfatici splenici e linfonodali. Nei reni dei suinetti alimentati con mangime contaminato con OTA, sono stati osservati lievi fenomeni degenerativi soprattutto a carico degli epitelii dei tubuli contorti distali, con aspetti di cariopicnosi, cariomegalia, mitosi e rigenerazione epiteliale.

È apparsa significativa l'analisi dell'espressione dell'mRNA di IL-6 e TNF- α nelle PBMC dei suini dei gruppi B e C. Secondo diversi autori l'IL-6 ed il TNF- α , durante l'intossicazione da OTA, possono essere implicate in attività pro-apoptotica. La somministrazione per 45 giorni di un mangime contaminato con 180-200 ppb di OTA ha comportato solo lievi fenomeni degenerativi a livello renale in tutti i suini esposti alla micotossina; alcuni Autori ritengono che 200 ppb di OTA per 45 giorni nella dieta non siano sufficienti per indurre tossicosi nel suino, effetto invece possibile se la somministrazione viene protratta per tre mesi. Si può concludere che la somministrazione per 45 giorni nella dieta di 180-200 ppb di OTA non è in grado di compromettere la risposta immunitaria ma può aumentare la produzione di citochine pro-apoptotiche; tale aumento appare sensibile all'integrazione con vitamina E della dieta.

Parole chiave: micotossine, ocratossina A, tossicità, linfociti, suino.

CELL-MEDIATED IMMUNE RESPONSE, HISTOPATHOLOGICAL FEATURES AND PROTECTIVE ROLE OF VITAMIN E IN EXPERIMENTALLY CONTAMINATED PIGLETS WITH OCHRATOXIN A (OTA)

The aim of this study was to establish if vitamin E supply in the natural OTA contaminated feed can contrast the toxic effect of OTA. Twenty four 28-day-old piglets were randomly subdivided into 6 groups and daily fed with: OTA free feedstuff, OTA free feedstuff supplied with vitamin E, feedstuff contaminated with 200 ppb of OTA supplied with vitamin E. Blood samples were collected for phenotypic characterization of T lymphocytes, MTT assay, cytokine RT-PCR and Ig detection. Tissue specimens were taken for histopathological evaluation. Expression of IL-6 and TNF- α was increased in the groups treated with OTA compared with control groups. Histopathology highlighted apoptotic lymphocytes in lymphoid tissues and multifocal degeneration of convolute distal tubules of all piglets fed with OTA contaminated feedstuff. It can be concluded that 200 ppb of OTA in the feedstuff do not compromise the immune response but can increase the production of pro-apoptotic cytokines which can be influenced by using a supply of vitamin E in the diet.

Key words: mycotoxins, ochratoxin A, toxicity, lymphocytes, pig

INDAGINE ANATOMO-ISTOPATOLOGICA SULL'ARTERIOSCLEROSI DEL CAVALLO

Anfossi Antonio G., Boeddu Laura, Antuofermo Elisabetta, Cabras Francesca L., Burrai Giovanni P., Nieddu Antonio M., Pirino Salvatore

Dipartimento di Patologia e Clinica Veterinaria. Sezione di Patologia Generale e Anatomia Patologica, Facoltà di Medicina Veterinaria. Università degli studi di Sassari

L'arteriosclerosi è una patologia multifattoriale a lento sviluppo con fattori eziopatogenetici comuni a tutti i vertebrati, compreso l'uomo. Scopo del nostro lavoro è stato quello di indagare sulla prevalenza e sugli aspetti anatomoistopatologici di questa patologia nel cavallo in Sardegna. Abbiamo preso in considerazione l'aorta toracica di 79 cavalli regolarmente macellati in Sardegna nel biennio 2006/08. L'aorta veniva sottoposta a colorazione macroscopica con Sudan IV e le lesioni venivano sezionate al criotomo per l'evidenziazione dei grassi sub-intimali. Una parte del campione veniva processata e sottoposta a colorazioni istochimiche (H.E., Tricomica di Masson, Pas, Alcian Blue, Weigert, Von Kossa) ed immunoistochimiche (Vimentina, α -actina-L, Fattore VIII, CD68). Le lesioni venivano distinte in 3 gradi: lieve, moderato e severo. Sono state riscontrate lesioni macroscopiche in 21 cavalli (26,5%). Di questi il 57,1% era rappresentato da femmine e il 42,9% da maschi. Macroscopicamente le lesioni si presentavano come formazioni a placca più o meno allungata, generalmente ovoidali, non sudanofile, interessanti prevalentemente il cono aortico e il primo tratto dell'aorta toracica. L'attribuzione di un grading per ciascuna lesione ha permesso di identificare 12 animali (15%) con lesioni di grado lieve, 3 soggetti (3,8%) con lesioni di grado moderato e 6 soggetti (7,6%) con lesioni di grado severo. L'IHC ha messo in evidenza una proliferazione di cellule muscolari lisce, l'assenza di macrofagi schiumosi e di neoangiogenesi. I fenomeni vasculopatici riscontrati sono difficilmente collegabili all'evoluzione filogenetica dell'apparato cardiovascolare in quanto le lesioni più gravi non compaiono costantemente negli animali più vecchi e sono interpretabili come manifestazione di una sclerosi intimale di Monckeberg riportata nell'uomo.

Parole chiave: cavallo, aorta, arteriosclerosi, immunoistochimica

ARTHEROSCLEROSIS OF THE HORSE: A MACROSCOPICAL AND HISTOPATHOLOGICAL STUDY

Artherosclerosis is a multifactorial disease with slow development sharing common eziopathogenetic factors in all vertebrates, including humans. Aim of our study was to investigate the prevalence and histopathological features of the disease in regular slaughtered horses of Sardinia. Seventy-nine thoracic aorta were stained with Sudan IV for macroscopic examination and lesions were sectioned on cryostat to detect fat within sub-intimal. Tissue sections were submitted to histochemical (HE, Masson trichromic, Pas, Alcian Blue, Weigert, Von Kossa) and immunohistochemical stains (vimentin, α -L-actin, Factor VIII, CD68). Lesions was classified into mild, moderate and severe grade. Macroscopic elongate to ovoid plaque-like lesions were found in 21 horses (26.5%). These lesions were Sudan negative and predominantly localized to the aortic arch and aortic thoracic tract

Twelve horses (15%) showed lesions of mild grade, 3 horses (3.8%) of moderate grade and 6 (7.6%) of severe grade. IHC revealed proliferation of smooth muscle cells and absence of foamy macrophages and neoangiogenesis. Phylogenetic evolution of cardiovascular system and vascular lesions are not closely related, because older animals do not show these lesions that are interpreted as Monckeberg's intimal sclerosis described in human.

Key words: horse, aorta, arteriosclerosis, immunohistochemistry

LEUCOENCEFALOMIELITE DA VIRUS MAEDI -VISNA IN OVINI DI RAZZA SARDA

Cancedda Giovanna Maria¹, Puggioni Giontonella¹, De Giudici Silvia¹, Demontis Francesca¹,
Ennio Bandino¹, Maestrale Caterina¹, Patta Cristiana¹, Macciocu Simona¹, Denti Stefano¹,
Pira Andrea², Carzedda Diego², Ligios Ciriaco^{1*}

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, “G. Pegreffi” – Sassari. ²Azienda Sanitaria
ASL 3 – Nuoro

Il virus Maedi-Visna (VMV) è un Lentivirus degli ovini nei quali, oltre a provocare lesioni caratterizzate da fenomeni linfoproliferativi cronici a carico della mammella, polmone e articolazioni, determina una leucoencefalomielite multifocale cronica, conosciuta come Visna, che a causa della sua bassa incidenza è poco descritta in Italia.

Qui di seguito abbiamo riportato gli aspetti morfologici e virologici di casi neuropatologici a seguito di infezioni naturali da VMV caratterizzati, in alcuni casi, dall'esclusivo coinvolgimento del midollo spinale.

Per questo scopo esami istopatologici ed analisi virologiche, volte a quantificare VMV mediante Sybr Green real-time PCR in vari distretti del sistema nervoso centrale (SNC), sono state eseguite su 7 ovini di razza Sarda provenienti da tre differenti greggi.

Negli animali colpiti la sintomatologia era caratterizzata da una atassia progressiva sino alla paralisi a carico del treno posteriore. Le lesioni istopatologiche erano caratterizzate dalla formazione di manicotti perivascolari di cellule mononucleate, lieve meningite mononucleare e malacia con vacuolizzazione della sostanza bianca ed imponente infiltrato di macrofagi. La distribuzione e la gravità delle lesioni infiammatorie nel SNC variavano notevolmente tra i vari casi. In maniera caratteristica, le sezioni trasversali seriali del midollo spinale dimostravano che le lesioni infiammatorie erano di tipo lineare e si propagavano nella sostanza bianca ininterrottamente, anche per lunghi tratti, nella stessa posizione. La quantità relativa di RNA virale nelle varie aree del SNC era direttamente correlata alla gravità del quadro lesivo.

Parole chiave: Visna-Maedi, ovino, leucoencefalomielite

MAEDI -VISNA VIRUS-ASSOCIATED LEUCOENCEPHALOMYELITIS IN SARDA BREED SHEEP

Maedi-visna virus (MVV) is a Lentivirus which causes chronic lymphoproliferative disorders in mammary gland, lung and limb joints. MVV also causes a chronic leucoencephalomyelitis which is commonly known as Visna. In Italy, because of the very low incidence this neurological disorder is little studied. In this survey, we carried out histopathological examinations and Sybr Green real-time PCR quantifications on the central nervous system of 7 sheep from 3 different flocks.

Clinical signs of a progressive ataxia followed by hindlimb paralysis were noted in all the animals. Histopathology was characterized by non-suppurative encephalomyelitis consisting of mononuclear perivascular inflammatory infiltrate, rare mild mononuclear meningitis and malacia with vacuolation of white matter and large foamy macrophages. Among the cases, neuroanatomical distribution and severity of the inflammatory damages varied notably. Interestingly enough, the serial transversal sections along the spinal cord demonstrated linear-shaped inflammatory lesions propagating continuously, even for long traits, at the same position in the white matter. Sybr Green real-time PCR analysis showed that severity of the lesions correlated with the amount of viral RNA.

Key words: Visna-Maedi, sheep, leucoencephalomyelitis

CORRELAZIONI CLINICO-PATOLOGICHE NELLE NEUROPATIE ASSONALI PERIFERICHE DEL CANE

Salvadori Claudia, Sonaglio Lucia, Falzone Cristian,^a Cantile Carlo

*Dipartimento di Patologia Animale – Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Pisa
^aClinica Veterinaria Valdinievole – Monsummano Terme (PT)*

Le malattie neuromuscolari sono clinicamente caratterizzate da diversi gradi di debolezza, atrofia muscolare, iporiflessia, atonia e deficit sensitivi. L'approccio diagnostico comprende un esame neurologico completo, la valutazione dei profili biochimico-clinici, l'esame elettrofisiologico e la biopsia di nervo e muscolo. Dal punto di vista patologico si distinguono neuropatie assonali e neuropatie demielinizzanti. In questo studio sono stati selezionati 38 casi di neuropatie assonali del cane, completi di esame elettromiografico e "follow-up", allo scopo di identificare le correlazioni clinico-patologiche utili per la valutazione della prognosi e per una migliore comprensione patogenetica della malattia. Dal punto di vista clinico è stata valutata l'insorgenza della sintomatologia (acuta o cronica), la gravità (con distinzione in soggetti deambulanti e non deambulanti), la terapia effettuata e l'esito della malattia (guarigione, stabilizzazione, peggioramento/decesso). Dal punto di vista patologico sono state valutate il numero di degenerazioni assonali, la perdita di fibre mieliniche, la presenza di fibre rigeneranti e di gemmazioni assonali, la presenza di fibrosi endonevriale e di edema subperinevriale. I dati sono stati analizzati con il test di Kruskal-Wallis. I fattori più importanti per un'indicazione prognostica sono risultati essere la perdita di fibre mieliniche e la fibrosi che, se assenti, sono associate generalmente ad una ripresa della funzionalità neurologica con guarigione del soggetto e il rilievo di gemmazioni assonali che, a differenza della presenza di singole fibre rigeneranti, sono associate ad una prognosi peggiore. La biopsia di nervo periferico riveste quindi un'importanza fondamentale per la definizione diagnostica e la valutazione della prognosi, anche se la diagnosi delle malattie neuromuscolari deve basarsi sempre su un approccio integrato tra indagine clinica, strumentale e neuropatologica.

Parole chiave: cane, neuropatie periferiche, malattie neuromuscolari, biopsia di nervo

CLINICOPATHOLOGICAL CORRELATIONS OF CANINE PERIPHERAL AXONOPATHY

Neuromuscular diseases are characterized by weakness, hyporeflexia, atonia and abnormal sensitivity. Clinical work-up includes a complete neurological examination, evaluation of biochemistry panel, electrophysiological studies and muscle and nerve biopsies. Axonal and demyelinating neuropathies can be identified with nerve biopsy. In this study, 38 cases of canine axonal neuropathy were selected. Clinically, onset (acute or chronic), severity (ambulatory or non-ambulatory), therapy and outcome of the diseases (recovery, stabilization, worsening/death) were evaluated. Number of axonal degenerations, loss of myelin fibers, presence of regenerating fibers, axonal sprouting, endoneurial fibrosis, and subperineurial edema were evaluated in nerve biopsies. Data were analyzed with Kruskal-Wallis test. The most significant prognostic value of morphological features were loss of myelin fibers and endoneurial fibrosis which, when absent, were associated with a more favorable outcome. Axonal sprouting was associated with a worse prognosis, differently from the presence of regenerating fibers. Nerve biopsy can give useful information both for diagnostic and prognostic evaluation. However, the correct approach to neuromuscular diseases needs an integrated diagnostic work-up including neurological examination, as well as electrodiagnostics and neuropathological examination.

Key words: dog, peripheral neuropathy, neuromuscular diseases, nerve biopsy

RINOSINUSITE MICOTICA IN UN GATTO: ISOLAMENTO DI *FUSARIUM SPP.*

Carminato Antonio, Danesi Patrizia, Vascellari Marta, Carniel Martina, Granato Anna, Mutinelli Franco

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, V. le dell'Università, 10 Legnaro (PD)

I miceti del genere *Fusarium* (*Cephalosporium*), famiglia Hypocreaceae sono specie ubiquitarie saprofiti del suolo in grado di comportarsi da patogeni opportunisti in alcune infezioni dell'uomo e degli animali. Si riporta un caso di rinosinusite di origine micotica causata da *Fusarium spp.* in un gatto. Il gatto femmina sterilizzata di 4 anni è stato presentato alla visita clinica per tumefazione del planum nasale e deformazione del profilo nasale. Accertamenti citologici, istologici ed istochimici effettuati sull'essudato e sui campioni di tessuto nasale evidenziavano un processo piogranulomatoso necrotico con presenza di ife fungine ramificate e settate. L'esame micologico culturale effettuato su materiale prelevato da tamponi nasali indicava la presenza di *Fusarium spp.* Inoltre, l'identificazione micologica è stata successivamente confermata da approfondimenti biomolecolari (PCR). In medicina veterinaria *Fusarium spp.* è stato isolato sporadicamente in lesioni cutanee, cheratiti, pielonefriti e infezioni sistemiche del cane e del gatto. Secondo gli autori questa è la prima segnalazione di rinosinusite sostenuta da *Fusarium* nel gatto.

Parole chiave: rinosinusite, gatto, miceti, *Fusarium*, ialoifomicosi

MYCOTIC RHINO-SINUSITIS IN A IN-DOOR CAT: ISOLATION OF *FUSARIUM SPP.*

Fungal species of the genus *Fusarium* (*Cephalosporium*), family Hypocreaceae are sporadic opportunistic pathogens in humans and other mammals. They are environmentally widespread as saprobes in soil and pathogens of plants and insects. A case of mycotic cranio-nasal deformation in a four-year old in-door female cat is described. Swelling of subcutaneous tissues of the nasal planum with deformation of nasal profile was observed. X-ray of the skull highlighted a soft tissue radiopacity filling the left frontal sinus with sino-cortical osteolysis. Cytology showed eosinophils, rare neutrophils and macrophages associated with necrotic material. Mycological culturing and PCR of nasal swabs were positive for *Fusarium spp.* Histological examination of nasal samples showed a pyogranulomatous process with the presence of numerous branching septate fungal hyphae, highlighted by PAS and Grocott histochemical stains. Itraconazole therapy after fungal isolation (5 mg/kg BID per os) was started with incomplete remission. *Fusarium* have a propensity to invade the skin both directly and through the bloodstream. Following initial colonization, localized infections develop in presence of predisposing factors such as trauma and immunosuppression. Different *Fusarium* species have been isolated from cases of mycetoma, onychomycosis, mycotic keratitis, pielonephritis and systemic infection in domestic animals. By Authors' knowledge this is the first case of rhino-sinusitis caused by *Fusarium* in cat.

Key words: rhino-sinusitis, cat, fungi, *Fusarium*, hyalohyphomycosis

EFFETTI DELL'ESPOSIZIONE AL CADMIO NEL CERVELLO DI *DANIO RERIO*

Favorito R.¹, Coppola M.², Di Napoli A.², Consiglio Grimaldi M.¹, Melluso G.²,
Ferrandino I.¹

¹Dipartimento delle Scienze Biologiche, Sezione di Biologia Evolutiva e Comparata, Università degli Studi di Napoli Federico II, via Mezzocannone 8, 80134, Napoli. ²Dipartimento di Biologia Strutturale e Funzionale, Università degli Studi di Napoli Federico II, via Cinthia, sede di Monte Sant'Angelo, Napoli

Nel presente lavoro sono stati valutati gli effetti dell'esposizione al cadmio (Cd) nel cervello di *Danio rerio*, comunemente noto come zebrafish, modello di riferimento per indagini eco-tossicologiche. Lo studio è stato condotto attraverso il raffronto tra l'analisi quantitativa di cadmio totale assorbito e la rivelazione immunocitochimica della proteina S100 per evidenziare possibili alterazioni cito-morfologiche di tutta la componente gliale indotte da questo metallo pesante. Sono stati utilizzati 36 esemplari adulti di zebrafish suddivisi in 2 gruppi, uno di controllo ed uno come test, esposto alla dose di 1mg/L di CdCl₂. I prelievi sono stati effettuati dopo 2, 7 e 16 giorni. La metodica APAT IRSA-CNR, Sezione 3000 "Metalli e specie metalliche", divisione 3010 è stata applicata per la valutazione del contenuto di cadmio totale nell'encefalo degli animali test rispetto ai controlli. I risultati hanno mostrato che gli animali esposti a CdCl₂ presentano un notevole aumento della quantità di Cd nei cervelli dei campioni test (2 giorni: 22.23 ppm ± 1.0; 7 giorni: 33.16 ppm ± 0.82; 16 giorni: 45.04 ppm ± 1.02), rispetto ai controlli (1.25 ppm ± 0.2). Il metodo ABC è stato applicato per l'identificazione immunocitochimica della componente gliale mediante l'impiego dell'anticorpo anti-S100 su sezioni seriali di encefalo. Negli esemplari di controllo una marcata positività di cellule e fibre gliali S100 immunoreattive è stata osservata in diverse porzioni encefaliche. Negli esemplari esposti al Cd si è evidenziato invece un decremento dell'immunoreattività, già apprezzabile a 2 e 7 giorni, raggiungendo il massimo dopo 16 giorni di esposizione. I dati dimostrano così una correlazione tra il decremento dell'espressione della proteina S100 e l'accumulo di Cd nell'encefalo di zebrafish. E' ipotizzabile che il Cd, attraversando la barriera emato-encefalica, così come altri metalli, vada ad accumularsi proprio nelle cellule gliali alterandone di conseguenza le caratteristiche strutturali e funzionali come l'espressione proteica.

Parole chiave: cadmio, tossicità, proteina S100, encefalo, zebrafish

INTRODUZIONE

Il cadmio (Cd), metallo pesante altamente tossico¹, è largamente distribuito nell'ambiente come conseguenza di attività naturali ed antropogeniche². Tra i metalli pesanti è tra i più pericolosi per la salute dell'uomo, essendo sia teratogeno che cancerogeno³. Numerosi studi evidenziano che il Cd induce neurotossicità e danni al tessuto cerebrale⁴. I meccanismi coinvolti sono essenzialmente indiretti come la generazione di ROS (Specie Reattive dell'Ossigeno) e perossidazione lipidica delle membrane⁵, inibizione dei sistemi di riparazione del DNA e distruzione dell'adesione cellulare⁶. Studi condotti su cervelli di topi⁷ riportano l'azione neurotossica del Cd. Studi su embrioni di zebrafish mostrano anche che il Cd inibisce la neurogenesi durante lo sviluppo del cervello⁸. Nei mammiferi il Cd si accumulerebbe in particolare nel cervello, inducendo cambiamenti morfologici nelle popolazioni delle cellule gliali⁹ ed incremento dell'espressione delle metallotioneine negli astrociti¹⁰. Gli astrociti posseggono proprietà fisiologiche e metaboliche che giocano un ruolo vitale nel mantenimento della normale omeostasi del cervello, svolgendo anche azione neuroprotettiva attraverso l'accumulo e la detossificazione di diversi ioni metallici¹¹. Queste cellule sono dotate di prolungamenti sottili e ramificati, che circondano i neuroni vicini, giungendo poi sulla superficie vascolare e piaie¹² e sono le prime cellule che vengono a contatto con molecole estranee che attraversano la barriera ematoencefalica¹¹. Inoltre è stato dimostrato che il Cd modula anche la differenziazione delle cellule gliali e comporta il decremento dell'espressione di markers strutturali, come la proteina gliofibrillare acida (GFAP) e la proteina S100¹³. La proteina S100 è prodotta, mantenuta e rilasciata dagli astrociti, tanniciti, oligodendrociti e cellule della glia radiale ed esercita effetti paracrini e autocrini su neuroni e glia. Essa partecipa nella regolazione dell'omeostasi del calcio agendo come stimolante o attivatore di altre proteine. Essa ha anche attività neurotrofica, inibisce la fosforilazione e regola la stabilità del citoscheletro¹⁴. Essendo il Cd un comune inquinante nelle acque superficiali può causare effetti dannosi su pesci ed altri organismi acquatici¹⁵. L'effetto del Cd sugli ecosistemi acquatici è stato e continua pertanto ad essere un'area attiva di ricerca¹⁶. Lo zebrafish (*Danio rerio*), teleosteo d'acqua dolce, è il più appropriato modello rappresentativo degli organismi acquatici

ed è frequentemente usato per studi embriologici, genetici e tossicologici¹⁷. Nel presente lavoro si riportano i dati sull'azione del Cd nel cervello di zebrafish, valutando in particolare le possibili alterazioni indotte da questo metallo a carico della glia. Tale studio è stato condotto attraverso la rivelazione immunocitochimica del marker gliale proteina S100 al fine di stabilire possibili alterazioni cito-morfologiche di tutta la componente gliale e parallelamente valutando i parametri quantitativi di Cd assorbito nel cervello.

MATERIALI E METODI

36 esemplari adulti di zebrafish sono stati acclimatati per due settimane, in vasche dotate di ossigenatore, mantenuti ad una temperatura di 26 °C, con fotoperiodo naturale e nutriti con cibo commerciale. Successivamente i pesci sono stati suddivisi in due vasche: una di controllo con acqua incontaminata ed una test in cui è stato aggiunto cloruro di cadmio (CdCl₂) in ragione di 1mg/L. I prelievi si sono effettuati dopo 2, 7 e 16 giorni. Gli esemplari raccolti sono stati anestetizzati in ghiaccio ed immediatamente sacrificati con taglio cervicale. La metodica utilizzata per la determinazione del cadmio totale nell'encefalo degli animali test rispetto ai controlli è APAT IRSA-CNR, Sezione 3000, "Metalli e specie metalliche", divisione 3010, "Trattamento preliminare dei campioni per l'analisi dei metalli mediante mineralizzazione attraverso il sistema aperto con acido nitrico e cloridrico, analizzati attraverso lo spettrofotometro ad assorbimento atomico in fiamma". Per le indagini istomorfologiche, gli encefali isolati sono stati fissati in Bouin per 24 ore, disidratati ed inclusi in paraffina. Il metodo Avidina-Biotina-Perossidasi (ABC) è stato applicato su sezioni seriali di 6 µm di encefalo con l'impiego dell'anticorpo anti-S100 (dil. 1/100, Sigma) per la valutazione di eventuali cambiamenti della distribuzione ed espressione del marker astrogliale, proteina S100, in condizioni basali e dopo esposizione al trattamento. La distinzione della glia è stata, inoltre, analizzata attraverso la colorazione citochimica cresyl-violetto.

RISULTATI

Le analisi effettuate hanno rivelato che il Cd nell'encefalo di zebrafish induce effetti neurotossici negli animali trattati rispetto ai controlli. I risultati hanno mostrato che gli animali

esposti a CdCl₂ presentano un notevole aumento della quantità di Cd nei cervelli dei campioni test (2 giorni: 22.23 ppm ± 1.0; 7 giorni: 33.16 ppm ± 0.82; 16 giorni: 45.04 ppm ± 1.02), rispetto ai controlli (1.25 ppm ± 0.2) (grafico 1). La colorazione cresyl-violetto ha evidenziato un progressivo aumento del numero e della grandezza delle cellule gliali negli animali test, soprattutto nel midollo (fig.1a,b), nel tetto e nel telencefalo. La rivelazione immunocitochimica della proteina S100 ha evidenziato nei controlli: a livello del midollo, una marcata positività di cellule e fibre (fig.2a); a livello ventricolare gli ependimociti sono ben identificabili; nel mesencefalo le fibre del tetto ottico appaiono immunoreattive (ir) (fig.2b); nel cervelletto la componente gliale appare ben identificabile (fig.2c), infine nel telencefalo si riconosce una diffusa immunoreattività. Negli esemplari esposti al Cd si è osservato, invece, un decremento dell'immunoreattività, già apprezzabile a 2 e 7 giorni, raggiungendo il massimo dopo 16 giorni di esposizione. In particolare, dopo 2 giorni si verifica un notevole decremento delle strutture S100(ir) nel midollo e nel tetto (fig.2d), così come dopo 7 giorni, dove sia a livello ventricolare sia nel cervelletto (fig.2e) il segnale appare meno marcato rispetto al controllo. Dopo 16 giorni d'esposizione al Cd la riduzione del segnale ir persiste nel midollo (fig.2f) così come nel tetto.

CONCLUSIONI

Questi risultati dimostrano una correlazione tra il decremento dell'espressione della proteina S100 e l'accumulo di Cd nell'encefalo di zebrafish. La proteina S100 partecipa nella regolazione dell'omeostasi del calcio agendo come stimolante o attivatore di altre proteine. Essa ha anche attività neurotrofica, inibisce la fosforilazione e regola la stabilità del citoscheletro¹⁴. Per cui si può supporre che il decremento dell'immunoreattività osservato nell'encefalo dei pesci trattati con Cd possa corrispondere ad una diminuzione della capacità di questa proteina con conseguente compromissione delle attività funzionali. I meccanismi coinvolti non sono stati ancora ben compresi. Lo stress ossidativo è stato diverse volte proposto come meccanismo principale della tossicità del Cd in diversi tessuti come reni¹⁸ e cervello¹⁹. Stark et al.¹³ hanno dimostrato che il cadmio decrementa l'espressione della proteina S100 e della GFAP, ipotizzando quindi che i metalli pesanti possono indurre l'inibizione delle funzioni delle cellule

gliali. Le caratteristiche e le ricerche del modello zebrafish potrebbero essere applicate per sostenere e completare gli studi condotti sui modelli mammiferi, oltre che esaminare gli effetti tossicologici su entrambi gli organismi²⁰.

BIBLIOGRAFIA

1. Hutton M. 1983. Sources of cadmium in the environment. *Ecotoxicol Environ Saf.* 7(1):9-24.
2. Bernard A. 2008. Cadmium & its adverse effects on human health. *Indian J Med Res* 128, pp 557-564.
3. Sullivan K, Waterman L. 1988. Cadmium and cancer: the current position. Report of an international meeting in London, September 1988. *Ann Occup Hyg.* 1988;32(4):557-60.
4. Im JY, Paik SG, Han PL. 2006. Cadmium-induced astroglial death proceeds via glutathione depletion. *Journal of Neuroscience Research* 83, pp. 301–308.
5. Shaikh ZA, Vu TT, Zaman K. 1999. Oxidative stress as a mechanism of chronic cadmium-induced Hepatotoxicity and renal toxicity protection by antioxidant. *Toxicol Appl Pharmacol* 154(1):256-63.
6. Waisberg M, Joseph P, Hale B, Beyersmann D. 2003. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology* 192: 95-117.
7. Webster WS, Valois AA. 1981. The toxic effects of cadmium on the neonatal mouse CNS. *J Neuropathol Exp Neurol* 40(3):247-57.
8. Chowb E, Nga Yu Hui M, Chi Lin C, Han Chenga S. 2008. Cadmium inhibits neurogenesis in zebrafish embryonic brain development. *Aquatic Toxicology* 87, 157–169.
9. Reyners H, Gianfelici de Reyners E, Maisin JR, Winneke G, Csicsaky M. 1982. Effects of heavy metals (Cd, Tl, Zn and Pb) on glial cells. *Neurobehav Toxicol Teratol* 4(6):651-4.
10. Sawada J, Kikuchi Y, Shibutani M, Mitsumori K, Inoue K, Kasahara T. 1994 Induction of metallothionein in astrocytes by cytokines and heavy metals. *Biol Signals* 3(3):157-68.
11. Tiffany-Castiglioni E, Qian Y. 2001. Astroglia as metal depots: molecular mechanisms for metal accumulation, storage and release. *Neurotoxicology* 22(5):577-92.
13. Elmquist JK, Swanson JJ, Sakaguchi DS, Ross LR, Jacobson CD. 1994. Development distribution of GFAP and vimentin in the Brazilian opossum brain. *Journal of Comparative* 344:283-296.

13. Stark M, Wolff JE, Korbmacher A. 1992. Modulation of glial cell differentiation by exposure to lead and cadmium. *Neurotoxicol Teratol* 14(4):247-52.
14. Donato R. 2003. Intracellular and Extracellular Roles of S100 Proteins. *Microscopy Research and technique* 60:540–551.
15. Perceval O, Couillard Y, Pinel-Alloul B, Gigue`re A, Campbell PGC. 2004. Metal-induced stress in bivalves living along a gradient of Cd contamination: relating sub-cellular metal distribution to population-level responses. *Aquat. Toxicol.* 69, 327–345.
16. Riddell DJ, Culp JM, Baird DJ. 2005. Behavioural responses to sublethal cadmium exposure within an experimental aquatic food web. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 431–441.
17. Hill AJ, Teraoka H, Heideman W, Peterson RE, 2005. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicol. Sci.* 86, 6–19.
18. Bagchi D, Vuchetich PJ, Bagchi M, Hassoun EA, Tran MX, Tang L, Stohs SJ. 1997. Induction of oxidative stress by chronic administration of sodium dichromate [chromium VI] and cadmium chloride [cadmium II] to rats. *Free Radic Biol Med.* 22(3):471-8.
19. Kumar R, Agarwal AK, Seth PK. 1996. Oxidative stress-mediated neurotoxicity of cadmium. *Toxicol Lett.* 89(1):65-9.
20. Linney E, Upchurch L, Donerly S. 2005. Zebrafish as a neurotoxicological model. *Neurotoxicol Teratol.* 27(1):175.

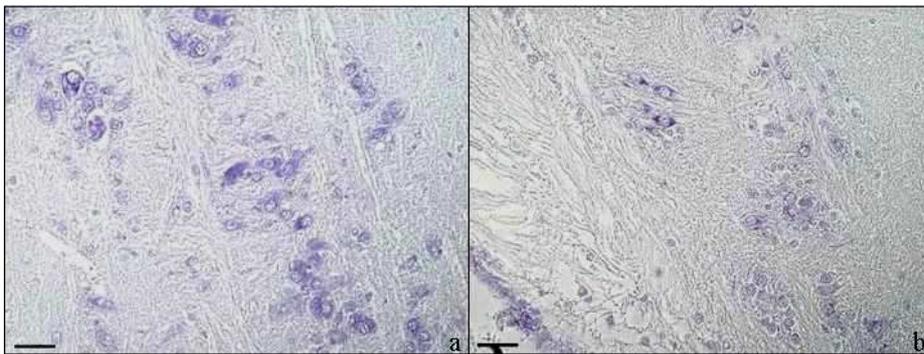


Figura 1: colorazione cresyl-violetto, midollo di Zebrafish. Aumento della componente gliale dopo 16 giorni di esposizione al Cd (a) rispetto al controllo (b). Barra 30 µm.

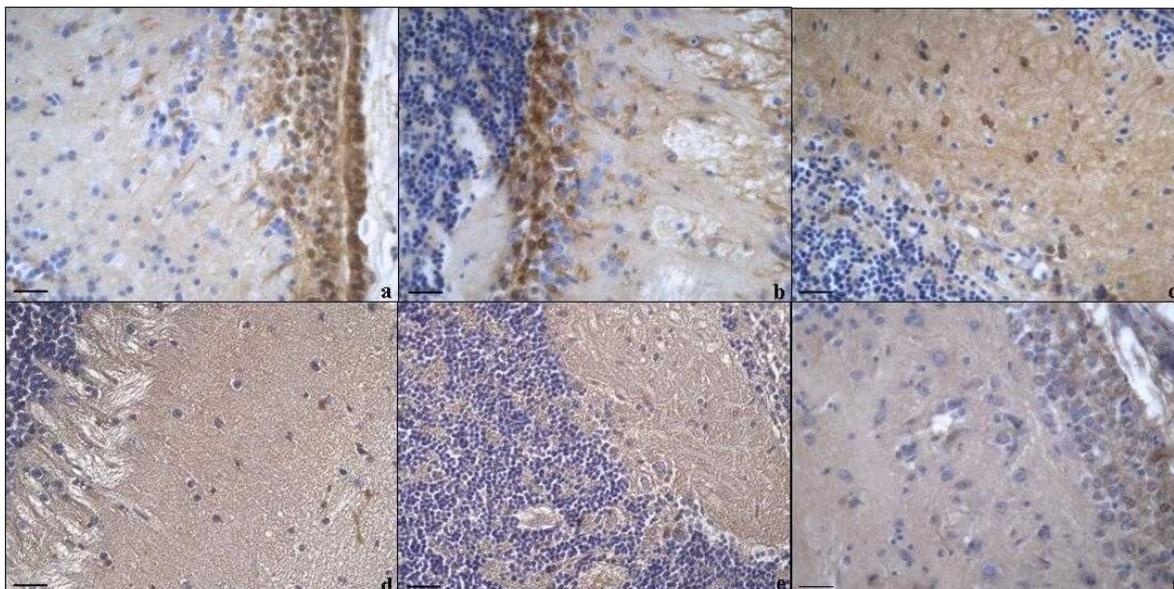


Fig. 2: Tecnica ABC, S100 (ir) nell'encefalo di Zebrafish. Fig. a, b, c. Controllo: si nota la marcata positività di cellule e fibre S100 (ir) a livello del midollo (a), del tetto ottico (b) e del cervelletto (c). Fig. d. Trattato a 2 giorni: decremento del segnale immunoreattivo a livello del tetto ottico. Fig. e. Trattato a 7 giorni: S100 (ir) ridotta nel cervelletto. Fig. f. Trattato a 16 giorni: segnale immunoreattivo quasi del tutto assente nel midollo. Barra 30 µm.

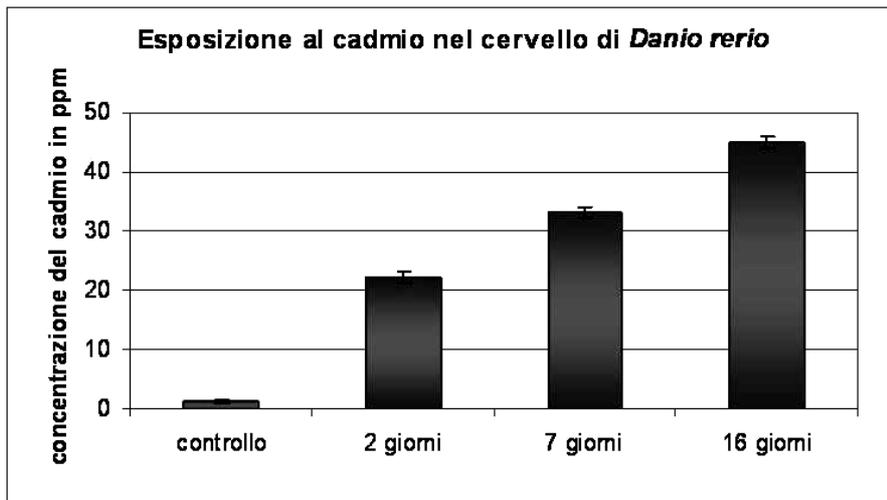


Grafico 1: Valutazione del contenuto di cadmio totale nell'encefalo di animali test rispetto ai controlli, durante il periodo di trattamento.

EFFECTS OF CADMIUM EXPOSURE ON THE *DANIO RERIO* BRAIN

The present report is an attempt to investigate the influence of cadmium exposure on the distribution of cadmium accumulation and S100 protein expression in brain of zebrafish (*Danio rerio*). Cadmium accumulation in brain was measured by APAT IRSA-CNR method, 3000 Section 3010 division. S100 protein expression was determined by ABC technique. 18 adult fishes were exposed to contaminated water (1mg/L of CdCl₂). Groups of 6 fishes were killed after 2, 7 and 16 days. Another 18 fishes were kept in uncontaminated water and constituted control animals. Cadmium concentration increases in brain just after 2 days and it reaches the maximum value after 16 days. The staining pattern of S100 protein, glial marker, in several regions of adult zebrafish brain was then assessed by ABC technique and the polyclonal antiserum anti S100 protein. After 2 and 7 days we observed a considerable decrement of the S100 immunoreactive structures. After 16 days Cd exposure, the reduction of S100 immunoreactivity is more evident. Following Cd treatment our data indicate that it exists a correlation between decrement of S100 protein expression and Cd accumulation found in the brain. Maybe cadmium crosses the blood-brain-barrier and it accumulates in the brain causing alteration of cellular functions, in particular in glial cells.

Keywords: cadmium, toxicity, S100 protein, brain, zebrafish

SCRAPIE NATURALE E SPERIMENTALMENTE INDOTTA *PER OS* IN OVINI DI RAZZA SARDA: RECENTI ACQUISIZIONI IN AMBITO PATOGENETICO

Marruchella Giuseppe (a), Ligios Ciriaco (b), Cancedda Maria Giovanna (b), Demontis Franca (b), Chiochetti Roberto (c), Clavenzani Paolo (c), Lalatta-Costerbosa Giovanna (c), Gioia Luisa (a), Di Guardo Giovanni (a)

(a) Università degli Studi di Teramo, Dipartimento di Scienze Biomediche Compare; (b) Istituto Zooprofilattico della Sardegna, Sassari; (c) Università degli Studi di Bologna, Dipartimento di Morfofisiologia Veterinaria e Produzioni Animali

Le placche del Peyer (PP) ed il sistema nervoso enterico (ENS), con particolare riferimento ai plessi mienterici (MP) e sottomucosi (SMP) ileali, costituiscono due distretti precocemente colonizzati ad opera dell'agente della scrapie ovina. Si riportano qui di seguito le esperienze condotte nel corso di svariati anni al fine di contribuire alla comprensione di alcuni cruciali eventi patogenetici che si realizzano nelle fasi precoci dell'infezione. Accurate indagini morfologiche (immunoistochimiche, in immunofluorescenza indiretta ed in microscopia laser confocale) sono state effettuate sugli MP e sugli SMP, nonché sulle PP ileali di ovini di razza Sarda con diverso genotipo. Ciò al fine di caratterizzare, in un primo tempo, le popolazioni cellulari dei plessi dell'ENS in grado di accumulare PrP^{Sc} (unitamente alla loro numerosità) e, in una seconda fase, l'innervazione delle PP ileali ed i suoi rapporti con le cellule follicolari dendritiche (FDC). Il campione di studio comprendeva 9 ovini ARQ/ARQ con scrapie naturale, 4 ARQ/ARQ con scrapie sperimentale indotta *per os* in fase clinica e 24 ovini di controllo (12 agnelli e 12 adulti) con diverso genotipo (ARQ/ARQ, ARR/ARQ, ARR/ARR). In tutti gli ovini scrapie-affetti l'accumulo di PrP^{Sc} ha coinvolto le cellule enterogliai ed i neuroni NOS-immunoreattivi (IR) e calbindina-IR dell'ENS, senza apparente perdita neuronale. Inoltre, non sono state riscontrate significative differenze nell'innervazione delle PP ileali in rapporto ad età, genotipo dell'ospite e presenza/assenza di PrP^{Sc} a livello dei follicoli, ove la presenza di fibre nervose è risultata del tutto occasionale.

Concludendo, particolare interesse suscitano sia l'apparente assenza di perdita neuronale nei plessi dell'ENS di ovini infetti sia la rarissima presenza di fibre nervose all'interno dei follicoli delle PP, ove numerose FDC albergavano depositi di PrP^{Sc}.

Lavoro eseguito con fondi gentilmente concessi dal MIUR (PRIN 2006).

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

NATURAL AND ORAL EXPERIMENTAL SCRAPIE IN SARDA BREED OVINES: RECENT PATHOGENETIC INSIGHTS

Ileal PPs and ENS plexuses (MPs and SMPs) play a crucial role in the early pathogenesis of sheep scrapie. This work summarizes what done by us throughout several years on early infection's pathogenesis. Detailed morphological (immunohistochemical, double-labelling indirect immunofluorescence and confocal microscopy) studies were performed on ileal MPs, SMPs and PPs from Sarda ovines with different PrP genotypes, in order to identify the ENS cell populations accumulating PrP^{Sc} during infection (along with their respective numerical consistency), and to characterize PP innervation and its relationships with FDCs. We investigated 9 natural scrapie-affected ARQ/ARQ sheep, 4 oral experimental scrapie-affected ARQ/ARQ sheep and 24 healthy controls (12 lambs and 12 adults) with different PrP genotypes (ARQ/ARQ, ARR/ARQ, ARR/ARR).

All scrapie-affected sheep showed PrP^{Sc} deposition in ENS enterogliai cells, NOS-IR and calbindin-IR neurons, with no apparent neuronal loss. No significant differences in ileal PP innervation were observed in relation to age, PrP genotype and PrP^{Sc} presence/absence in PP follicles, where nerve fibres were rarely found.

In conclusion, the apparent lack of neuronal loss in ENS plexuses from scrapie-affected sheep is of special concern, along with a very limited presence of nerve fibres within PP lymphoid follicles, where numerous FDCs were still seen harbouring PrP^{Sc}.

This work was carried out with a research grant from MIUR (PRIN 2006).

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

STUDIO RETROSPETTIVO SULLE NEOPLASIE OSSERVATE NEI MAMMIFERI DEL BIOPARCO DI ROMA NEL PERIODO 1999-2008

Eleni Claudia*, **Friedrich Klaus Gunther °**, **Scholl Francesco ***, **Cocumelli Cristiano***, **Sarli Giuseppe^{oo}**, **Bacci Barbara °o**, **Di Cerbo Pilar^o**, **Falchi Antonella***, **Leonardi Leonardo[^]**, **Ciorba Alessandro[^]**

(* *Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, Roma.* (°) *Fondazione Bioparco, Roma.* (°°) *Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bologna.* (^) *Dipartimento di Scienze Biopatologiche, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Perugia*

Numerosi sono gli studi relativi ai tumori in animali selvatici o presenti negli zoo, ma la maggior parte riguardano singoli casi e provengono da paesi extraeuropei. Si riportano i casi di neoplasie riscontrate mediante esame istologico e, ove opportuno ai fini diagnostici, immunoistochimico, su un campione di 210 mammiferi del Bioparco di Roma, sottoposti ad esame autoptico nel periodo 1999-2008. Complessivamente sono stati evidenziati 28 casi di neoplasie in 25 soggetti. Il 68% (17/25) dei soggetti, con uno o più tumori, apparteneva alle famiglie dei felidi, canidi o all'ordine dei primati, costituenti il 31% (65/210) del campione. Maggiormente colpite le femmine (17/25) rispetto ai maschi. Per quanto riguarda il comportamento biologico delle neoplasie osservate, 17 tumori erano maligni e 11 benigni e coinvolgevano principalmente l'apparato digerente (32,1% - n=9), genitale (21,4% - n=6) e tegumentario-mammario (17,8% - n=5). I carcinomi (10) nei vari organi ed i leiomiomi nell'utero (5) sono i tumori più frequentemente osservati. La percentuale di neoplasie in rapporto alle necroscopie (13,3%) e quella dei tumori maligni rispetto ai benigni (60,7%) sono risultate più elevate rispetto a quanto riportato in letteratura nei mammiferi da zoo. A motivo dell'alto numero di neoplasie evidenziate a carico dell'apparato genitale e della mammella, l'interessamento nel genere femminile è risultato più rilevante. Tipi diversi di neoplasie, in accordo con quanto riportato dalla letteratura, sono stati diagnosticati nelle varie specie di mammiferi selvatici. Per alcuni di questi, come ad esempio il carcinoma a cellule squamose del cavo orale, si è ipotizzata sia nell'uomo sia negli animali da compagnia una genesi legata alla maggior presenza di inquinanti ambientali in ambito urbano. Dal momento che il Bioparco è situato al centro di Roma, una tale ipotesi patogenetica potrebbe essere presa in considerazione quale fattore predisponente.

Parole chiave: tumori, mammiferi selvatici, zoo

NEOPLASIA IN MAMMALS AT THE ZOOLOGICAL GARDEN (BIOPARCO) OF ROME, 1999-2008

Several studies on tumors of wild and zoo animals have been performed, most of them referring to single cases and non European countries. Cases of tumors were histologically and immunohistochemically diagnosed in 210 necropsied mammals, coming from Rome Zoological Garden (Bioparco) between 1999 and 2008. A total of 28 neoplasms were recorded in 25 animals. The 68% (17/25) of the animals with one or more tumors were felids, canids and primates, contributing for 31% (65/210) of the examined mammals. The neoplasms occurred more frequently in females (17/25). In regard to the biological behavior of the observed tumors, 17 were malignant and 11 benign, and involved mostly digestive (9), genital (8), and integumentary-mammary (5) systems. Carcinomas in different tissues (10) and leiomyoma in uterus (5) were the most represented neoplasms.

When compared with literature, neoplasms, found in 13,3% of performed necropsies, presented an higher prevalence, such as malignant tumors (60,7%). Females were more affected, due to genital and mammary tumors.

In agreement with scientific reports, different kind of tumors were diagnosed. For some of them, *i.e.* oral squamous cell carcinoma, a correlation with high environmental pollution in urban area has been proposed both in men and in animals. Therefore, location of the zoological garden in the center of Rome could be evaluated as a predisposing factor.

Key words: neoplasia, wild mammals, zoo

INDICATORI ISTOLOGICI DI MALIGNITA' NEI TUMORI MELANOCITARI UVEALI DEL CANE

Giudice Chiara, Bonfanti Anna, Grieco Valeria

Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, via Celoria 10, 20133 Milano, Italy. Tel +39 02 50318105, fax +39 02 50318106

I tumori melanocitari sono le neoplasie primarie oculari più frequenti nel cane; più spesso benigni, sono tuttavia segnalati casi di metastasi da melanomi uveali. Il principale criterio istologico prognostico è l'indice mitotico (IM), mentre l'invasione dei vasi sclerali è controversa, considerata ora estensione ai canali preformati di deflusso dell'acqueo, ora espressione di aggressività della neoplasia.

Scopo del presente lavoro è definire parametri istologici di significato prognostico. 18 melanomi oculari da 18 cani sono stati processati per l'istologia, colorati con ematossilina eosina ed immunocolorati con anticorpi (mAb) anti MMP2; MMP9 e Ki67. Sono stati valutati l'indice mitotico (IM), l'indice di proliferazione (IP = n° nuclei KI67+/n° nuclei totali), l'estensione della necrosi e l'infiltrazione linfocitaria intratumorale. In base ai dati di follow up (14/18): 9 cani erano in salute, 5 deceduti: 3 per cardiopatia e 2 con segni di metastasi encefaliche. 16 neoplasie erano masse nodulari, 2 rivestivano l'intera uvea. Cellule neoplastiche invadevano i vasi sclerali in 11 casi, 13 avevano foci di necrosi, 6 linfociti intratumorali, l'IM solo in 3 casi era >1. La reattività immunoistochimica dei mAb anti-MMPs, ma non quella di Ki67, risultava alterata dal trattamento di decolorazione. L'IP variava da 4 a 38,7% (media 19,7).

In base ai dati raccolti tra le caratteristiche istologiche considerate solo l'indice mitotico era correlato alla prognosi. La frequenza dell'invasione dei vasi sclerali, anche in tumori benigni, avvalorava l'ipotesi che essa fosse in relazione alla struttura anatomica dell'angolo di filtrazione. Infine, i 2 soli tumori con prognosi infausta presentavano un pattern di crescita intraoculare inusuale nel cane ma correlato, nell'uomo, ad una prognosi negativa.

Parole chiave: cane, occhio, melanoma, Ki67

CANINE UVEAL MELANOCYTIC TUMOURS: HISTOLOGICAL INDICATORS OF MALIGNANCY

Uveal melanocytic tumor is the most common primary intraocular neoplasm in the dog. Although mostly benign, metastasizing malignant tumors were reported. Currently, mitotic index (MI) is considered the most reliable histologic criteria for prognosis, whereas it is controversial if tumor invasion of scleral vessel is the extension through preformed aqueous flow canals, or a true vessel invasion. Aim of this report was to define histological parameters of prognostic value. 18 eyes, from 18 dogs, were processed for histology, stained with hematoxylin and eosin and immunostained with mAbs anti-MMP2, MMP9 and Ki67 (MIB1). MI, proliferative index (MIB1+ nuclei/total nuclei *100), intratumoral necrosis and lymphocytes infiltration were evaluated.

Based on follow up data (14/18): 9 dogs were healthy, 5 died: 3 for cardiopathy and 2 with a diagnosis of metastatic brain diseases. 16 tumors were a single mass, 2 lined circumferentially the uvea. Scleral vessels were invaded in 11 cases, necrosis was present in 13, lymphocytes in 6. In only 3 cases MI was >1. Bleaching of sections affected immunostaining with MMPs (false positive signal), Ki67 was unaltered. IP ranged 4-38.7% (media 19.7).

Among the histological features considered, only MI was prognostic. Neoplastic invasion of scleral vessel was frequent, most likely related to the anatomical structure of the filtration angle rather than an indicator of malignancy. In the present cases, both tumors with a negative prognosis showed a circumferential pattern of growth, a pattern unusual for canine melanomas while it is related with a worst prognosis in human beings.

Key words: dog, eye, melanoma, Ki67

STUDIO PRELIMINARE SULLA MORFOPATOLOGIA TESTICOLARE IN *FELIS CATUS* DOPO INOCULAZIONE DI CLOREXIDINA DIGLUCONATO

Losacco Caterina¹, Aiudi Giulio², De Sandro Salvati Alessandra², Leone Rosa¹, Lacalandra Giovanni Michele², Perillo Antonella¹

¹Dipartimento di Sanità e Benessere Animale; ²Dipartimento di Produzione Animale. Facoltà di Medicina Veterinaria. Università degli Studi di Bari.

L'inoculazione intratesticolare di agenti chimici ad azione sclerosante rappresenta un metodo contraccettivo in grado di provocare infertilità transitoria c/o permanente attraverso l'induzione di azoospermia. Tale metodo costituisce un approccio alternativo a quello chirurgico, attualmente più diffuso, ma di difficile applicazione su larga scala a causa principalmente dei costi di gestione degli animali. Nel presente studio preliminare vengono riportate le modificazioni istomorfologiche osservate nei testicoli di 6 gatti europei dopo inoculazione intratesticolare di una soluzione di clorexidina digluconato al 5% come metodo sperimentale di castrazione chimica. Dopo 60 giorni dall'inoculazione è stata eseguita una orchietomia. L'indagine istopatologica condotta sul parenchima testicolare ha evidenziato modificazioni morfologiche significative costituite soprattutto da un marcato sovvertimento strutturale dell'organo con conseguente riduzione delle capacità funzionali. Tali alterazioni sono riconducibili ad atrofia dei tubuli seminiferi, necrosi dell'epitelio germinativo, imponente fibrosi interstiziale ed infiltrazione interstiziale leucocitaria con interessamento dei tubuli seminiferi.

Parole chiave: gatto, fibrosi, necrosi, testicolo, clorexidina

INTRODUZIONE

La castrazione nei gatti rappresenta la procedura di scelta comunemente impiegata per la contraccettazione ed il controllo della sovrappopolazione. Il metodo attualmente più diffuso è quello chirurgico. Questo intervento, però, oltre ad essere non sempre gradito dai proprietari, richiede tempi e costi di gestione che lo rendono di difficile applicazione su larga scala. Tra i metodi sperimentali alternativi di sterilizzazione della popolazione felina si annoverano i trattamenti ormonali (come l'utilizzo di progestinici, di androgeni, di analoghi sintetici del GnRH), l'immunocontraccettazione (verso i recettori del GnRH, dell'LH e le proteine della zona pellucida), o ancora l'applicazione di ultrasuoni come metodo di sterilizzazione meccanica.

La castrazione chimica è un metodo contraccettivo alternativo utilizzato nei maschi che provoca infertilità di lunga durata e verosimilmente definitiva attraverso l'induzione di azoospermia. L'agente chimico ideale ad azione contraccettiva dovrebbe essere una sostanza in grado di arrestare definitivamente la spermatogenesi e l'androgenesi senza sortire effetti avversi locali o sistemici.

La clorexidina è un agente chimico ad azione sclerosante, la cui somministrazione intraepididimale è in grado di indurre azoospermia in 91 giorni, senza indurre effetti locali e sistemici indesiderabili (Kutzler e Wood, 2006).

Nel presente studio preliminare sono stati valutati gli aspetti istomorfologici di testicoli di gatto trattati per via iniettiva intratesticolare con una soluzione acquosa al 5% di clorexidina digluconato e sottoposti a orchietomia a distanza di 60 gg dal trattamento. La valutazione morfopatologica consente indirettamente di valutare l'efficacia del metodo di castrazione chimica.

MATERIALI E METODI

La sperimentazione è stata condotta su 6 gatti europei di età compresa tra gli 8 mesi e i 4 anni e di peso variabile dai 2 ai 5 Kg che all'esame clinico si presentavano in buone condizioni di salute. Gli animali in studio sono stati sottoposti ad esame obiettivo particolare dell'apparato riproduttore, a misurazione dei testicoli e sono stati trattati con 1mg/kg/sc di Ketoprofene (Vet-Ketofen®, Merial, Italia). Per la somministrazione

di clorexidina si è resa necessaria una sedazione con 0,3 mg/kg/im di Butorfanolo Tartrato (Dolorex®, Intervet, Italia) e 150 µg/Kg/im di Medetomidina (Domitor®, Pfizer, Italia). L'anestesia è poi stata mantenuta con Isoflurano all'1,5% (Isoba-Schering-Plough, Italia). Il trattamento è stato effettuato somministrando in ciascun testicolo al livello del mediastino 0,2 ml di soluzione acquosa di clorexidina digluconato al 5% per via percutanea ecoguidata. A 24h dal trattamento è stato somministrato Prednisolone alla dose di 1mg/kg/sc (Novosterol®, Ceva Vetem, Italia).

A distanza di 2 mesi dal trattamento si è intervenuti con l'asportazione chirurgica dei testicoli, cui è seguita una terapia antibiotica a base di Amoxicillina (Amoxysol LA®, Bayer, Italia, 15mg/kg/sc).

I testicoli prelevati sono stati quindi prontamente fissati in formalina salata al 10%. Le sezioni di circa 4 µ sono state colorate con varie metodiche routinarie tra le quali la Van Gieson e la Tricromica di Masson.

RISULTATI

Clinicamente, l'inoculazione intratesticolare di clorexidina digluconato non ha causato reazioni sistemiche in nessuno dei soggetti trattati. I tempi di recupero postoperatori sono stati rapidissimi, non prevedendo questa tecnica incisione della cute ma solo l'iniezione del composto chimico direttamente nel testicolo. I testicoli alla palpazione presentavano un discreto aumento delle dimensioni e una certa dolorabilità che si era sviluppata dalle 48 alle 72 ore successive al trattamento, tutti segni gradualmente regrediti nel corso di circa 3 settimane.

L'osservazione microscopica dei testicoli ha rivelato modificazioni morfologiche significative, caratterizzate da fenomeni flogistici di tipo cronico e regressivo necrotico. La flogosi era contrassegnata da un modico infiltrato prevalentemente costituito da linfociti e da qualche plasmacellula (fig.1). Il quadro prevalente era dominato da una diffusa proliferazione fibrosa dell'interstizio e da un marcato ispessimento della membrana basale tubulare che si rendevano responsabili di progressiva atrofia ed involuzione dei tubuli seminiferi (fig. 2-3). La componente tubulare presentava inoltre vacuolizzazione del citoplasma e riduzione del numero delle cellule germinali con scomparsa di spermatociti e spermatogoni (fig.4) assieme ad evidenti fenomeni di necrosi coagulativa diffusa anche alle

cellule interstiziali del Ledyig (fig. 5). La spermatogenesi era diminuita ed in parte assente a causa del marcato sovvertimento morfostrutturale del parenchima testicolare.

In qualche caso il connettivo interstiziale lasso esibiva aspetti di degenerazione mucosa (fig. 6).

DISCUSSIONE

L'esame morfopatologico ha dimostrato che l'inoculazione intratesticolare dell'agente chimico può indurre fenomeni regressivo-necrotici seguiti da una diffusa proliferazione fibrosa, responsabile della coartazione e atrofia dei tubuli seminiferi. La presenza di una modica reattività flogistica cronica e di un infiltrato costituito in prevalenza da linfociti nell'interstizio e nei tubuli seminiferi poteva considerarsi espressione di una reattività nei confronti della sostanza iniettata o conseguenza del danno degenerativo necrotico a carico del tessuto testicolare.

Nel complesso l'imponente fibrosi interstiziale e gli spiccati fenomeni involutivi dei tubuli seminiferi associati alla rarefazione e alla necrosi dell'epitelio germinativo erano tali da determinare un marcato sovvertimento strutturale del parenchima testicolare con conseguente riduzione delle capacità funzionali dell'organo.

CONCLUSIONI

La singola somministrazione intratesticolare di clorexidina digluconato ha indotto in tutti i soggetti trattati modificazioni morfopatologiche tali da compromettere la attività spermigenica

dell'organo. L'efficacia dell'azione contraccettiva della clorexidina veniva confermato dalla rarefazione e necrosi dell'epitelio germinativo, nonché dall'imponente fibrosi interstiziale e dai conseguenti fenomeni involutivi dei tubuli seminiferi.

Il presente studio, preliminare ad una più ampia ricerca, già consente di affermare che l'inoculazione intratesticolare di clorexidina digluconato potrebbe costituire un metodo alternativo alla sterilizzazione chirurgica poiché sicuro ed efficace in grado di bloccare l'attività riproduttiva nei gatti maschi.

BIBLIOGRAFIA

- Bruce D., Barnett: "Chemical vasectomy of domestic dogs in the Galapagos islands". *Theriogenology*. 1985 March; 23(3): 499-509.
- Kutzler M., Wood A.: "Non-surgical methods of contraception and sterilization". *Theriogenology*. 2006 Aug; 66(3): 514-25.
- Munson L.: "Contraception in felids". *Theriogenology*. 2006 Jul 1; 66(1): 126-34.
- Pineda M.H., Dooley M.P.: "Surgical and chemical vasectomy in the cat". *Am J Vet Res*. 1984 Feb; 45(2): 291-300.
- Pineda M.H., Hepler D.I.: "Chemical vasectomy in dogs. Long term study". *Theriogenology*. 1981 Jul; 16(1): 1-11.
- Pineda M.H., Reimers T.J., Faulkner L.C., Hopwood M.L., Seidel G.E. Jr: "Azoospermia in dogs induced by injection of sclerosing agents into the caudae of epididymes". *Am J Vet Res*. 1977 Jun; 38(6): 831-8.

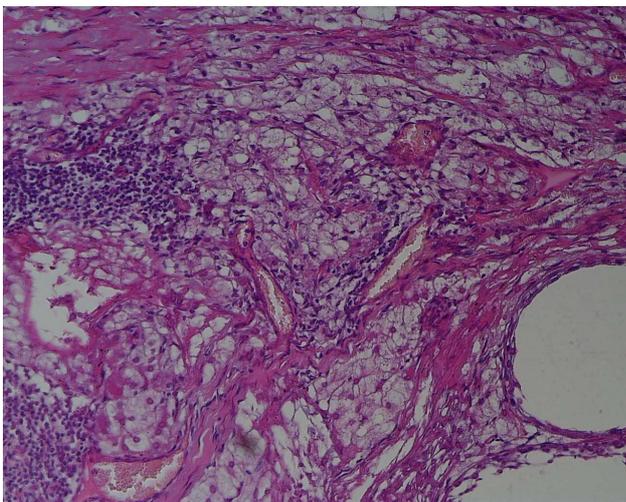


Figura 1. Flogosi interstiziale. Sovvertimento morfostrutturale del parenchima testicolare che appare modificamente infiltrato da un essudato cellulare (E.E. 40X)

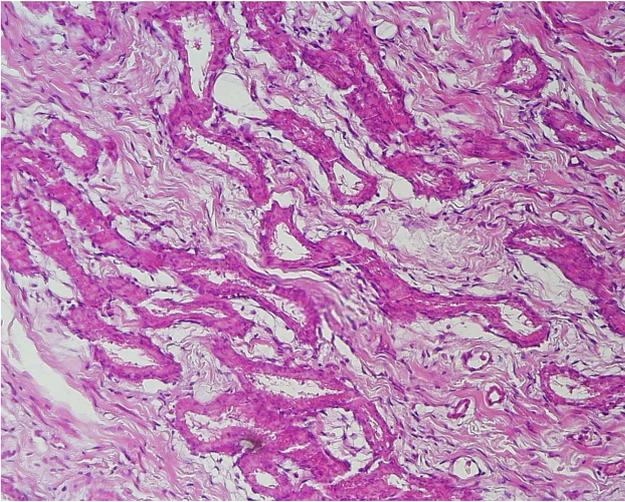


Figura 2. Atrofia testicolare. Spiccati fenomeni involutivi dei tubuli seminiferi di aspetto irregolare ed atrofico (E.E. 40X)

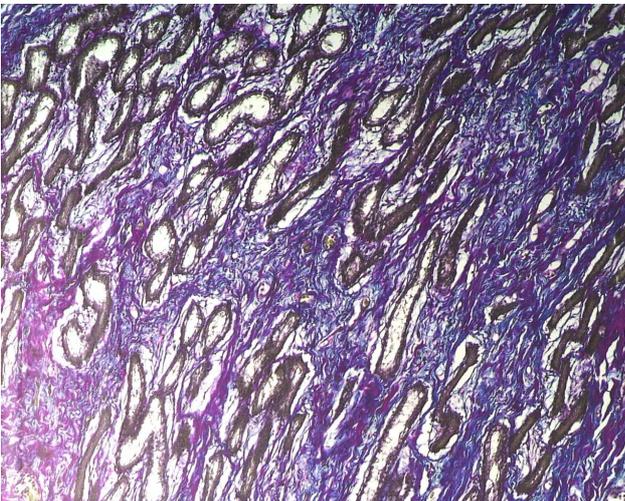


Figura 3. Fibrosi. Fibrosi diffusa e coartazione dei tubuli seminiferi (Tricromica di Masson, 20X)

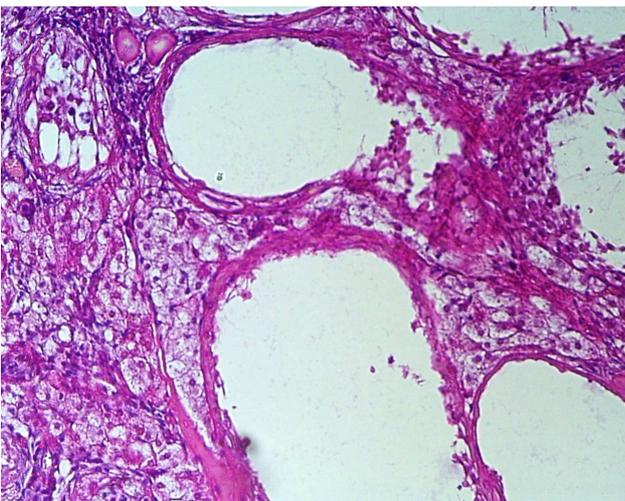


Figura 4. Degenerazione testicolare. Diffusa proliferazione fibrosa dell'interstizio e marcato ispessimento della membrana basale dei tubuli seminiferi che presentano una riduzione o totale scomparsa del numero delle cellule germinali e scomparsa di spermatociti e spermatogoni. La spermatogenesi è diminuita ed in parte assente (E.E. 40X)

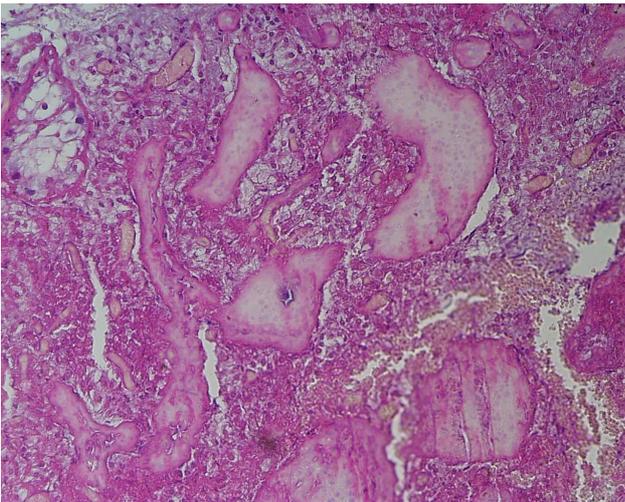


Figura 5. Necrosi tubulare. Evidenti fenomeni di necrosi coagulativa coinvolgente la quasi totalità dei tubuli seminiferi (E.E. 40X)

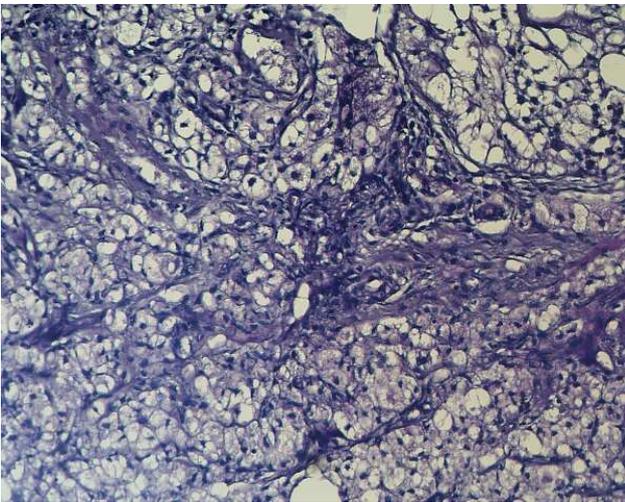


Figura 6. Mixedema (E.E. 40X)

PRELIMINAR STUDY ON THE MORPHOPATHOLOGICAL TESTES FEATURES IN *FELIS CATUS* AFTER INOCULATION WITH CHLORHEXIDINE DIGLUCONATE

Injection of sclerosing agents into testes induced a long-lasting and likely irreversible azoospermia.

The technique represents an alternative approaches to surgical castration and appears suitable for large scale sterilization programs in male cats.

This preliminary study used domestic cats to test the efficacy and safety of intratesticular injection of a solution of chlorhexidine digluconate 5%. Sterilization was performed 60 days after a single bilateral injection.

Histomorphological analysis of testes showed a significant morphological changes, including atrophy of the seminiferous tubules, significant necrosis in the seminiferous epithelium as well as presents of fibrosis in interstitil spaces. Infiltration of leucocytes was also observed.

Key words: cat, fibrosis, necrosis, testis, chlorhexidine

PARATOPIE DISCALI IN DICIANNOVE CANI: RISONANZA MAGNETICA (RM) E ISTOPATOLOGIA

Mandrioli Luciana¹, Bacci Barbara¹, Panarese Serena¹, Dolera Mario², Malfassi Luca², Bombardi Cristiano³, Bettini Giuliano¹

¹Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Alma Mater Studiorum – Università di Bologna. ²Centro per lo studio e la cura delle malattie neurologiche degli animali domestici, La Cittadina, Romanengo (CR). ³Dipartimento di Morfofisiologia Veterinaria e Produzioni Animali, Facoltà di Medicina Veterinaria, Alma Mater Studiorum – Università di Bologna.

Le paratopie discali (intervertebral disk disease – IVDD) rappresentano nel cane una frequente patologia, accompagnata da dolore spinale, deficit motori, sensoriali e viscerali, che si verifica quando il disco degenerato danneggia le strutture neurali. Lo studio è stato condotto su 19 casi di IVDD non traumatici e mielopatici campionati nel 2007-2008 e casi di controllo privi di patologie discali. In tutti i discopatici è stato effettuato un esame di RM tramite scansioni secondo i tre piani fondamentali del rachide, T1- T2 dipendenti, dello spessore di 3 mm, cui è seguito l'intervento chirurgico durante il quale, mediante mini-emilaminectomia o peduncolectomia, sono stati asportati dei frammenti discali, poi processati per l'istologia e colorati con EE, Alcian e secondo la metodica di Gruber. La casistica è composta da 9 femmine e 10 maschi, con età media di 8 anni: 6 Bassotti, 2 Pastore Tedesco, 1 Rottweiler, 1 Dalmata, 1 Bassetthound, 1 Beagle, 1 Bracco Italiano e 6 meticci. La RM ha diagnosticato 16 prolassi e 3 protrusioni, con segni di esordio acuto in 11 casi, con simile coinvolgimento dei diversi tratti vertebrali. Tutti i cani hanno mostrato recupero funzionale post-chirurgico. L'esame istologico dei frammenti discali ha evidenziato in 11 casi tessuto riferibile sia ad anello fibroso che a nucleo polposo, in 4 solo anello fibroso, in 2 solo nucleo polposo, in 2 il materiale era insufficiente. La componente cellulare condrocitica ha mostrato segni di degenerazione, di grado moderato-grave, riferibili a ipoplasia, apoptosi e megalocitosi; in 12 casi erano presenti aree di necrosi e in un caso si sono osservati segni di flogosi cronica. In 9 casi il materiale discale era costituito da una componente calcificata. Infine, le fibre dell'anello fibroso presentavano gradi variabili di disorganizzazione. Il test di Fisher non ha evidenziato correlazioni significative tra diagnosi RM (prolasso o protrusione) e componenti erniate (anello fibroso o nucleo polposo) o presenza di necrosi.

Parole chiave: paratopie discali intervertebrali, cane, risonanza magnetica, istopatologia

INTRODUZIONE

Le paratopie discali rappresentano una patologia di frequente riscontro nel cane. Storicamente si distinguono due forme di IVDD: Hansen di tipo 1 o estrusione del nucleo polposo e Hansen di tipo 2 o protrusione dell'annulus fibroso. La patologia si accompagna ad un ampio ventaglio di segni clinici, quali dolore spinale e deficit motori, sensoriali e viscerali, che si verificano quando il disco degenerato danneggia le strutture neurali, esercitando compressione o contusione su di esso. Accanto alla radiologia convenzionale, classicamente impiegata per la conferma di patologia discale, da circa dieci anni è in uso la risonanza magnetica (RM), metodica in grado di fornire anche informazioni dettagliate riguardanti la struttura dei dischi intervertebrali e del midollo spinale.

I meccanismi patogenetici delle paratopie discali sono stati studiati soprattutto su modelli sperimentali murini, che hanno permesso di evidenziare nelle discopatie una progressiva perdita di proteoglicani, acqua e collagene II della matrice del nucleo polposo (Zhou et al, 2008). La maggior parte di queste alterazioni degenerative è attribuita a danni dei condrociti, rappresentati da una progressiva riduzione numerica tramite apoptosi ed uno *shift* del tipico profilo cellulare da condrocitico, simil-fisalifero, in fibrocitico. Nel cane recentemente sono stati condotti alcuni studi retrospettivi su casi spontanei, ma non è mai stato operato un confronto fra gli aspetti morfologici visualizzati tramite RM con l'istopatologia.

MATERIALI E METODI

Diciannove dischi intervertebrali collezionati nel 2007 da cani colpiti da paratopie discali rappresentano l'oggetto dello studio. A questi sono stati aggiunti casi di controllo, cioè cani sottoposti ad esame autoptico ma che in anamnesi non avevano riportato segni di patologie discali e dai quali sono stati prelevati dischi intervertebrali completi. La diagnosi di paratopia discale si è basata sull'esame clinico. L'esame RM (1 Tesla, GE Signa MR Scanner, General Electric Medical Systems) ha confermato la diagnosi clinica tramite scansioni secondo i tre piani fondamentali del rachide, T1- T2 dipendenti, dello spessore di 3 mm. I frammenti discali asportati in sede intraoperatoria mediante mini-emilaneotomia o peduncolotomia sono stati fissati in formalina e processati secondo metodica istologica di routine.

Sezioni seriate sono state anche sottoposte a colorazione istochimica secondo quanto suggerito da Gruber e colleghi (2002) per i dischi intervertebrali, al fine di distinguere meglio le componenti condrocitiche del nucleo da quelle dell'anello fibroso. La metodica consiste in una combinazione di ematossilina di Weigert, alcian blu e rosso picrosirius (rosso sirio e acido picrico) che evidenzia i proteoglicani in blu e il collagene in rosso. L'impiego di tale colorazione ha avuto anche lo scopo di individuare il tipo di materiale discale estruso/protruso. Infine è stato utilizzato il test di Fisher per la correlazione fra diagnosi RM di IVDD e la natura dei frammenti discali (anello fibroso e/o nucleo polposo) e la tipologia delle lesioni istologiche.

RISULTATI

La casistica è composta da 9 femmine e 10 maschi, con età media di 8 anni: 6 Bassotti, 2 Pastore Tedesco, 1 Rottweiler, 1 Dalmata, 1 Bassetthound, 1 Beagle, 1 Bracco Italiano e 6 meticci. La RM ha diagnosticato 16 estrusioni (prolassi)(Fig.1) e 3 protrusioni, con segni di esordio acuto in 11 casi, con simile coinvolgimento dei diversi tratti vertebrali. Tutti i cani hanno mostrato recupero funzionale post-chirurgico. L'esame istologico dei frammenti discali ha evidenziato in 11 casi tessuto riferibile sia ad anello fibroso che a nucleo polposo, in 4 solo anello fibroso, in 2 solo nucleo polposo, in 2 il materiale era insufficiente. La componente cellulare condrocitica ha mostrato segni di degenerazione, di grado moderato-grave, riferibili a ipoplasia, apoptosi e megalocitosi (Fig.2); in 12 casi erano presenti aree di necrosi (Fig.3) e in un caso si sono osservati segni di flogosi cronica. In 9 casi il materiale discale era costituito da una componente calcificata. Infine, le fibre dell'anello fibroso presentavano gradi variabili di disorganizzazione e perdita di orientamento (Fig 4 e 5). I risultati sono riassunti in Tabella 1. Non sono state rilevate correlazioni significative (test di Fisher) tra la diagnosi RM (estrusione o protrusione) e la natura dei frammenti discali asportati (anello fibroso o nucleo polposo) o la tipologia delle lesioni istologiche.

DISCUSSIONE

Il disco intervertebrale (IVD) normale è costituito da una struttura pressoché cilindrica, che comprende un nucleo polposo centrale (NP), un

anello fibroso (AF) flessibile formato da lamelle collagene, e un *endplate* cartilagineo interposto fra il disco e le vertebre adiacenti. Nello sviluppo embrionale dei mammiferi la colonna vertebrale deriva dall'aggregazione di cellule mesenchimali attorno alla notocorda; quest'ultima progressivamente scompare ad esclusione delle aree che andranno a formare il nucleo polposo. Le cellule residue sono caratterizzate da nucleo piccolo e condensato e da ampi vacuoli citoplasmatici (cellule simil-fisalifere). Nell'uomo, prima del raggiungimento della maturità scheletrica, le cellule della notocorda scompaiono progressivamente; al contrario, nei roditori e in alcuni mammiferi permangono fino all'età adulta (Urban e Roberts, 2003). Nel cane l'età della scomparsa delle cellule della notocorda avviene intorno ai 12 mesi (Hunter, 2004; Hansen, 1952), in seguito il nucleo polposo viene ripopolato da cellule simil-condrocitiche (Zhou et al., 2008). Il ruolo delle cellule della notocorda non è stato completamente chiarito, ma recentemente è emerso che sono implicate nella produzione di proteoglicani e quindi nel mantenimento dell'idratazione del nucleo polposo (Cappello et al., 2006; Erwin e Inman 2006).

E' stato osservato inoltre che le razze non condrodistrofiche mantengono le cellule della notocorda fino in età adulta, pertanto sono protette dallo sviluppo di IVDD. Le razze condrodistrofiche come il Beagle invece non mantengono questo tipo di cellule e tendono a sviluppare IVDD più precocemente (Bray e Burbidge, 1998; Hunter 2004).

La degenerazione dei dischi intervertebrali è strettamente correlata nell'uomo con le paratopie discali (Urban e Roberts, 2003). I dischi degenerati infatti perdono progressivamente la capacità di resistere a forze di compressione e torsione, di conseguenza sono maggiormente soggetti a fenomeni di protrusione o estrusione (Iatridis e Gwynn, 2004).

Nel presente studio istologico condotto sul materiale discale erniato, le lesioni più frequentemente osservate sono state di tipo degenerativo, sia a carico del NP (megalocitosi e atrofia delle cellule simil-condrocitiche, necrosi e mineralizzazione), sia dell'anello fibroso (disorganizzazione e perdita di orientamento delle lamelle). Tali alterazioni suggeriscono che, analogamente all'uomo, anche nel cane i processi degenerativi rappresentano un evento precedente e/o predisponente l'IVDD.

E' tuttavia da considerare come lo studio istologico di IVD in corso di patologia spontanea

sia fortemente condizionato dalla scarsa quantità di materiale disponibile. Infatti la morfologia dei dischi erniati può essere estremamente variabile, potendo comprendere materiale proveniente dal NP, dal AF o dalla cartilagine. Nel presente studio sebbene 11 casi fossero costituiti da AF e NP, in 6 casi è stata evidenziata una sola delle due componenti (4 solo AF, 2 solo NP). La colorazione proposta da Gruber si è rivelata estremamente utile nel riconoscimento del materiale erniato e nell'identificazione della componente cellulare condrocitica.

Nell'uomo il riassorbimento del materiale discale erniato è stato associato con la fagocitosi che si manifesta nei processi infiammatori (Moore et al., 1996); in questo studio tuttavia in un solo caso si è rilevata la presenza di macrofagi, pertanto è possibile presupporre un ruolo secondario dell'infiammazione nella evoluzione dell' IVDD nel cane.

Dalla presente indagine è emerso inoltre che la razza più frequentemente interessata era il Bassotto (31,5%). Riguardo alla localizzazione della paratopia, i tratti vertebrali cervicale, toracico e lombare erano ugualmente coinvolti e i segmenti maggiormente interessati erano T12-T13. Inoltre le estrusioni sono risultate più frequenti delle protrusioni. Queste osservazioni trovano ampio riscontro nella letteratura veterinaria (Besalti et al., 2006; Penning et al., 2006).

In conclusione l'esame istopatologico, in particolare con l'ausilio della colorazione di Gruber, consente il riconoscimento del materiale erniato e degli eventuali fenomeni degenerativi a carico di NP e/o AF. Sebbene non vi sia una correlazione fra la diagnosi RM (estrusione/protrusione) e la natura dei frammenti discali asportati, sembra che alterazioni di tipo degenerativo siano comunque alla base della patogenesi dell'IVDD nel cane.

BIBLIOGRAFIA

1. Besalti O, Pekcan Z, Sirin YS, Erbas G "Magnetic resonance imaging findings in dogs with thoracolumbar intervertebral disk disease: 69 cases (1997-2005)" *J Am Vet Med Assoc* 2006; 6:902-908
2. Bray JP, Burbidge HM "The Canine Intervertebral Disk. Part Two: Degenerative Changes-Nonchondrodystrophoid versus Condrodystrophoid Disks" *J Am Anim Hosp Assoc* 1998; 34:135-44.

3. Cappello R, Bird JL, Pfeiffer D, Bayliss MT, Dudhia J: “Notochordal cell produce and assemble extracellular matrix in a distinct manner, which may be responsible for the maintenance of healthy nucleus polposus” *Spine* 2006; 31:873-882.
4. Erwin WM, Inman RD: “Notochord cells regulate intervertebral disc chondrocyte proteoglycan production and cell proliferation” *Spine* 2006, 31:1094-1099.
5. Gruber HE, Ingram J, Hanley EN: “An improved staining method for intervertebral disc tissue” *Biotec&Histochem* 2002; 77:81-83.
6. Iatridis JC, Gwynn IA: “Mechanisms for mechanical damage in the intervertebral annulus fibrosus” *J Biomech* 2004; 37:1165-1175.
7. Hansen HJ “A pathologic-anatomical study on disc degeneration in dog” *Acta Orthop Scand Suppl* 11:1-117.
8. Hunter CJ, Matyas JR, Duncan NA: “Cytomorphology of notochordal and chondrocytic cells from the nucleus polposus: a species comparison” *J Anat* 2004; 357-362
9. Moore RJ, Vernon-Roberts B, Fraser RD, Osti OL, Schembri M: “The origin and fate of herniated lumbar intervertebral disc tissue” *Spine* 1996, 21:2149-2155
10. Penning V, Platt SR, Dennis R, Cappello R, Adams V: “Association of spinal cord compression seen on magnetic resonance imaging with clinical outcome in 67 dogs with thoracolumbar intervertebral disc extrusion” *J Small Anim Pract* 2006; 47:644-650.
11. Urban JPG e Roberts S: “Degeneration of intervertebral disc” *Arthritis Res Ther* 2003; 5:120-130.
12. Zhou GQ, Yang F, Leung VVL e Cheung KMC: “Molecular and cellular biology of the intervertebral disc and the use of animal models” *Current Orthoped* 2008; 22:267-273.

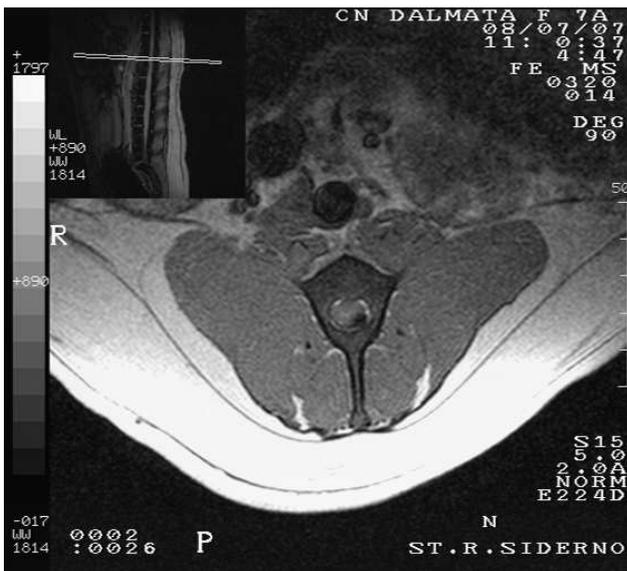


Figura 1. RM (caso n.3). Estrusione discale mineralizzata a sede dorso-laterale sinistra in L2-L3 determinante marcata compressione neurale.

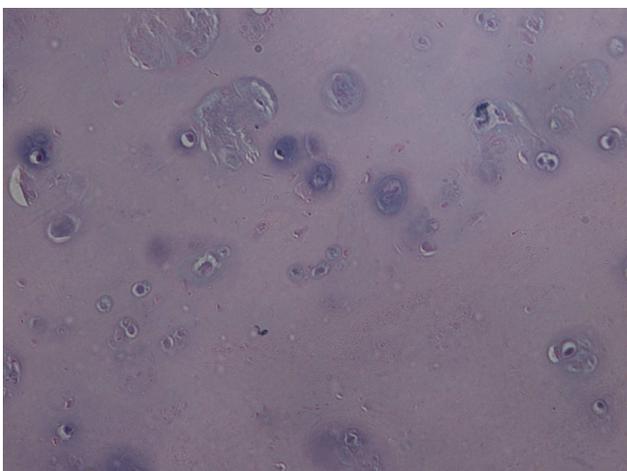


Figura 2. Degenerazione dei condrociti, atrofia e necrosi. EE. Ob.40X.

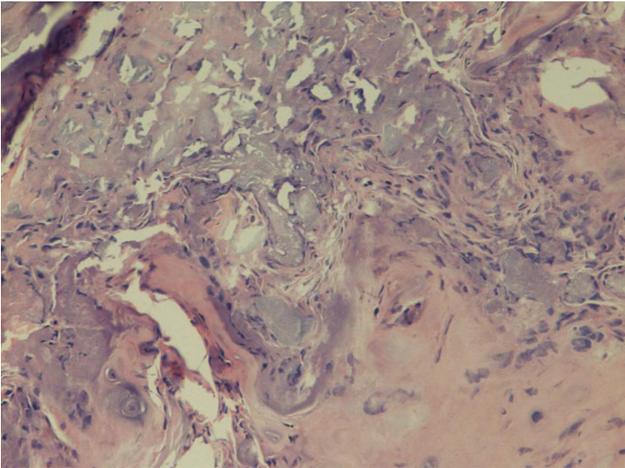


Figura 3. Aree multifocali di necrosi sia del nucleo polposo che dell'anello fibroso. EE. Ob.20X

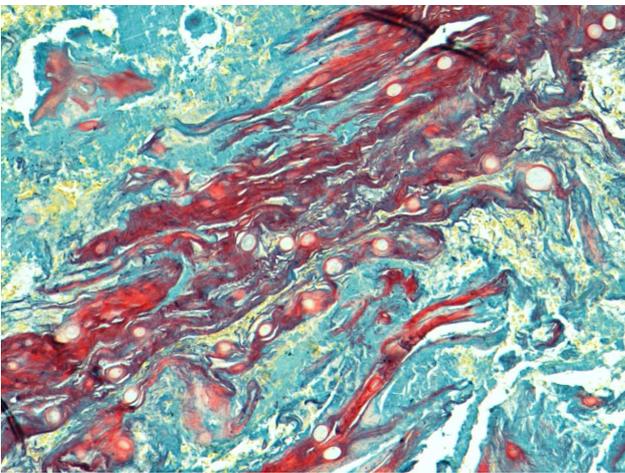


Figura 4. Aree di necrosi e disorganizzazione delle lamelle fibrose. Gruber. Ob.20x

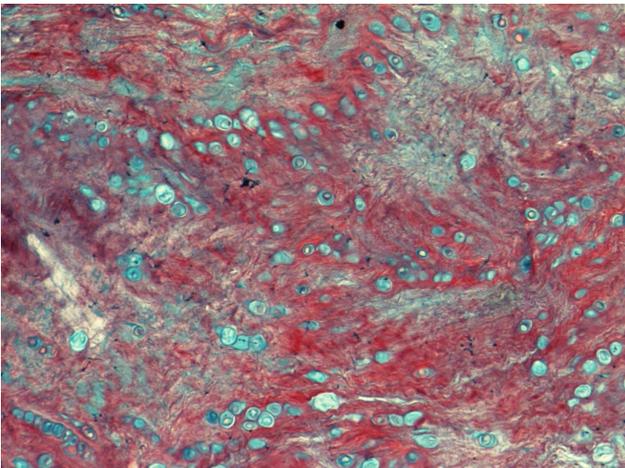


Figura 5. Disorganizzazione e perdita di orientamento delle lamelle dell'anello fibroso. Gruber Ob. 20x

Caso	Segnalamento			Risonanza Magnetica			Istopatologia					
	Razza	Sesso	Età	Diagnosi RM	Decorso	Tratto spinale	AF*	NP	INF	NEC	MIN	DEG
1	Rottweiler	F	10	P	C	L4-S1	■					
2	Bassotto	F	13	E	A	C4-C5		■		■		
3	Dalmata	F	7	E	A	L1-L2	■	■		■	■	
4	Meticcio	F	5	E	A	L1-L2		■			■	
5	Meticcio	M	6	E	A	C3-C4	■	■				
6	Beagle	M	4	E	A	C2-C3	■	■		■	■	
7	Bassotto	F	6,5	E	C	T13-L1	■	■		■	■	
8	Meticcio	M	11	E	A	C3-C4	■	■		■	■	
9	Bassotto	F	11	E	A	C4-C5	■	■		■		
10	Bassetthound	F	9	E	C	T13-L1						
11	Pastore Tedesco	M	9	P	C	L1-L2	■			■		
12	Bassotto	F	9	E	A	L1-L2		■			■	
13	Bassotto	M	6	E	A	T11-T12	■	■		■	■	
14	Meticcio	F	7	E	C	T12-T13		■	■	■	■	
15	Pastore Tedesco	M	10	P	C	L1-L2	■	■		■		
16	Bracco Italiano	M	6	E	A	T12-T13	■	■		■		
17	Meticcio	M	10	E	C	C6-C7	■					
18	Bassotto	M	6	E	A	L5-L6						
19	Meticcio	M	6	E	C	T12-T13	■	■		■	■	

Tabella 1.

M=maschio;
 F=femmina;
 E=estrusione;
 P=protrusione;
 A=acuto; C=cronico;
 AF=anello fibroso;
 NP=nucleo polposio;
 INF=infiammazione;
 NEC=necrosi;
 mIN=mineralizzazione;
 DEG=degenerazione dei condociti.
 AF*=in tutti i casi era apprezzabile la disorganizzazione delle lamelle.

MAGNETIC RESONANCE IMAGING (MRI) AND HISTOPATHOLOGICAL FINDINGS IN DOGS WITH INTERVERTEBRAL DISK DISEASE (IVDD)

IVDD is a frequent canine disorder, accompanied by a wide range of clinical signs occurring when a degenerated disk damages the neural structures. Nineteen disks, collected during 2007-2008, affected by non traumatic IVDD and myelopathy were selected. Dogs without history of IVDD were added. Surgical disk fragments were formalin-fixed and routinely processed for histology. Serial sections were also stained with HE, Alcian and Gruber stains. There were 9 females and 10 males; the mean age was 8 years; breeds included 6 mongrels, 6 Dachshund, 2 German Shepherd, 1 Rottweiler, 1 Dalmatian, 1 Bassetthound, 1 Beagle, and 1 Bracco Italiano. MRI confirmed the clinical disease and diagnosed 16 prolapses (bulgings) and 3 protrusions, with a majority of acute onsets. Histology of disks revealed annulus and nucleus fragments in 11 cases, annulus only in 4, nucleus only in 2, and insufficient material in 2 cases. Chondrocytes showed moderate-severe degeneration, with hypoplasia, apoptosis and megalocytosis. Foci of necrosis and mineralization were also observed. The annular fibers were variably disarranged. Fisher test failed to demonstrate a correlation MRI diagnosis and histopathological findings.

Key words: IVDD, dog, MRI, histopathology

SU DI UN CASO DI ANEMIA INFETTIVA EQUINA CON COINVOLGIMENTO DEL TESSUTO CEREBRALE

Marruchella Giuseppe (a), Romanelli Pasquale (b), Marsilio Fulvio (a), Di Guardo Giovanni (a)

(a) Università degli Studi di Teramo, Dipartimento di Scienze Biomediche Comparate; (b) Azienda USL di Pescara, Servizio Veterinario.

L'anemia infettiva equina (AIE) è una malattia lentivirale degli equidi le cui segnalazioni in Italia hanno conosciuto un deciso incremento negli ultimi anni.

Viene qui descritto un caso di AIE spontaneamente insorto in un cavallo maschio adulto, con contestuale coinvolgimento della compagine encefalica dell'animale.

L'esame necroscopico del cavallo ha evidenziato: modico edema sottocutaneo, versamenti sierosi in sede splancnica, lieve epato-splenomegalia, iperplasia linfonodale diffusa, nefropatia bilaterale, rare petecchie subpleuriche.

Le principali lesioni microscopiche osservate sono state: epatite interstiziale non purulenta e splenite iperplastica con imponente emosiderosi; linfadenite iperplastica diffusa; nefrite interstiziale e glomerulonefrite membrano-proliferativa e mesangio-proliferativa, associate a marcata emosiderosi; miocardite interstiziale non purulenta. D'interesse il rilievo di quadri di encefalite e di leucocerebellite multifocali non purulente. La sostanza bianca cerebellare risultava particolarmente interessata, con contestuale emosiderosi, ma senza apparente demielinizzazione.

Nonostante il documentato neurotropismo dell'agente causale dell'AIE, in pochi casi d'infezione è stato descritto un coinvolgimento del sistema nervoso centrale. Si stima che circa il 2% dei cavalli sieropositivi presentino tale condizione, finora non descritta nella popolazione equina del nostro Paese. Ciò supporta ulteriormente tale modello di infezione anche ai fini della diagnosi differenziale delle neuropatie nella specie equina, nonché ai fini dello studio comparato della neuropatogenesi dell'infezione da virus dell'immunodeficienza umana (HIV).

Parole chiave: equino, anemia infettiva equina, encefaliti virali, diagnosi differenziale, patologia comparata.

INTRODUZIONE

L'anemia infettiva equina (AIE) è una malattia infettiva e contagiosa, propria degli equidi, a decorso acuto o cronico, caratterizzata da viremia persistente, febbre ricorrente, debilitazione progressiva e, nei casi più gravi e terminali, da un intenso stato oligocitemico. L'AIE è sostenuta da un virus che presenta caratteristiche morfologiche, fisiche e chimiche proprie dei lentivirus (fam. *Retroviridae*). Il virus è veicolato da insetti ematofagi, che si comportano esclusivamente come vettori meccanici. Alla penetrazione del virus nell'organismo fa seguito un'intensa replicazione nelle cellule parassitate ed in modo particolare all'interno dei macrofagi. La formazione di immunocomplessi riveste importanza primaria nella patogenesi dell'AIE [1].

Viene qui descritto un caso di AIE spontaneamente insorto in un cavallo, con contestuale coinvolgimento della compagine encefalica dell'animale.

MATERIALI E METODI

Il cavallo in esame era un castrone sauro a crini lavati, derivato A.T.P.R., di 10 anni di età e risultato positivo al test di Coggins. Alla visita clinica, il soggetto mostrava depressione del sensorio, difficoltà locomotorie (astenia, atassia), edemi nelle porzioni declivi del corpo (particolarmente evidenti in corrispondenza del prepuzio) ed aumento di volume di tutti i linfonodi esplorabili. Il cavallo è stato quindi sottoposto ad eutanasia e successivo esame necroscopico. Una vasta gamma di tessuti sono stati campionati, immediatamente fissati in formalina neutra tamponata al 10% e processati per le relative indagini istopatologiche ed istochimiche.

RISULTATI

L'esame necroscopico ha evidenziato un modico edema sottocutaneo associato alla presenza di versamenti sierosi in sede splancica. Il fegato appariva aumentato di volume, con quadri di periepatite villosa e noduli fibro-calcifici riferibili alla migrazione di larve di strongili. Tutti i linfonodi risultavano marcatamente iperplastici; tale iperplasia si dimostrava particolarmente pronunciata a livello del linfonodo splenico. La milza appariva aumentata di volume ed alla

sezione di taglio mostrava un aspetto granuloso, conseguente all'ingrossamento dei corpuscoli malpighiani. Una piccola milza accessoria ("extra lien") era presente a livello del legamento gastro-splenico. I reni apparivano tumefatti e decolorati. Le indagini istopatologiche ed istochimiche hanno dimostrato la presenza di una grave epatite interstiziale non purulenta multifocale associata ad imponente emosiderosi (Fig. 1a). Altrettanto evidenti l'emosiderosi splenica (Fig. 1b) ed il marcato coinvolgimento renale, con quadri di glomerulonefrite subacuto-cronica e di nefrite interstiziale non purulenta multifocale (Fig. 1c) associati al deposito di emosiderina in sede glomerulare (Fig. 1d) e tubulare (Fig. 1e). Da segnalare, infine, la presenza di una lieve miocardite interstiziale non purulenta (Fig. 1f). Di particolare interesse risultava altresì il riscontro di contestuali lesioni di encefalite (Fig. 2a-b) e di leucocerebellite non purulenta multifocali (Fig. 2c-d). Le lesioni coinvolgevano soprattutto la sostanza bianca cerebellare, nel cui contesto si osservava la presenza di numerosi manicotti perivascolari costituiti da elementi linfo-plasmacellulari ed istiocitari (Fig. 2c-d), talvolta associata al deposito di discreti accumuli di emosiderina (Fig. 2d), ma senza apparente demielinizzazione (Fig. 2e-f).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nonostante il documentato neurotropismo dell'agente causale dell'AIE, in pochi casi d'infezione è stato segnalato un documentato coinvolgimento del sistema nervoso centrale. Si stima che circa il 2% dei cavalli sieropositivi presentino tale condizione [2, 3], finora non descritta tuttavia nella popolazione equina del nostro Paese. Le lesioni cerebrali osservate in corso di AIE sono direttamente associate e conseguenti alla replicazione dell'agente causale. Ciò supporta ulteriormente tale modello di infezione anche ai fini della diagnosi differenziale delle neuropatie nella specie equina, nonché ai fini dello studio comparato della neuropatogenesi dell'infezione da virus dell'immunodeficienza umana (HIV) [4].

BIBLIOGRAFIA

1. Andreani E., Flammini C.F., Gentile G., Mandelli G. (1998) *Retroviridae*. In: Farina R., Scamozza S. "Trattato di Malattie Infettive degli Animali", 2a Ed. UTET, 745-804.

2. Oaks J.L., Long M.T., Baszler T.V. (2004) Leukoencephalitis associated with selective viral replication in the brain of a pony with experimental chronic equine infectious anemia virus infection. *Veterinary Pathology* 41, 527-532.

3. AFIP Wednesday Slide Conference n° 3, 2° October 1996 (<http://healthnet.md.chula.ac.th/>).

4. Leroux C., Cadorè J.L., Montelaro R.C. (2004) Equine Infectious Anemia Virus (EIAV): what has HIV's country cousin got to tell us? *Veterinary Research* 35, 485-512.

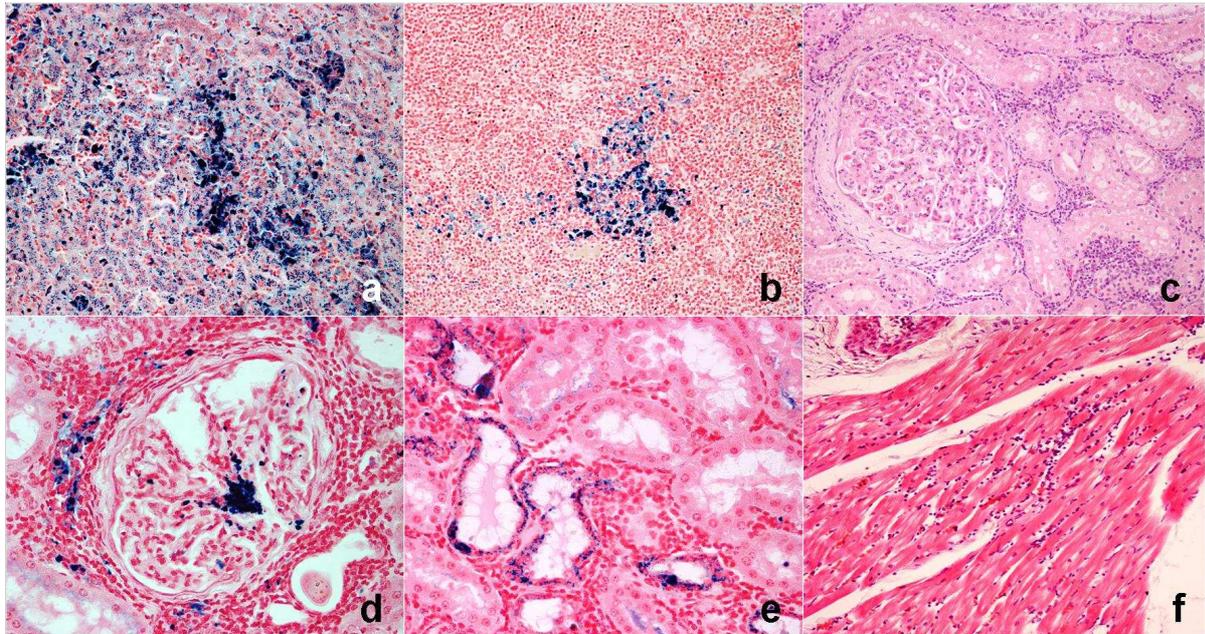


Fig. 1. Le indagini istopatologiche ed istochimiche hanno dimostrato la presenza di una grave epatite interstiziale non purulenta multifocale associata ad imponente emosiderosi (a). Altrettanto evidenti l'emosiderosi splenica (b) ed il marcato coinvolgimento renale, con quadri di glomerulonefrite subacuta-cronica e di nefrite interstiziale non purulenta multifocale (c), associati al deposito di emosiderina in sede glomerulare (d) e tubulare (e). Da segnalare, infine, la presenza di una lieve miocardite interstiziale non purulenta (f). Sezioni colorate con ematossilina-eosina (c, f) e con la metodica di Perls (a, b, d, e).

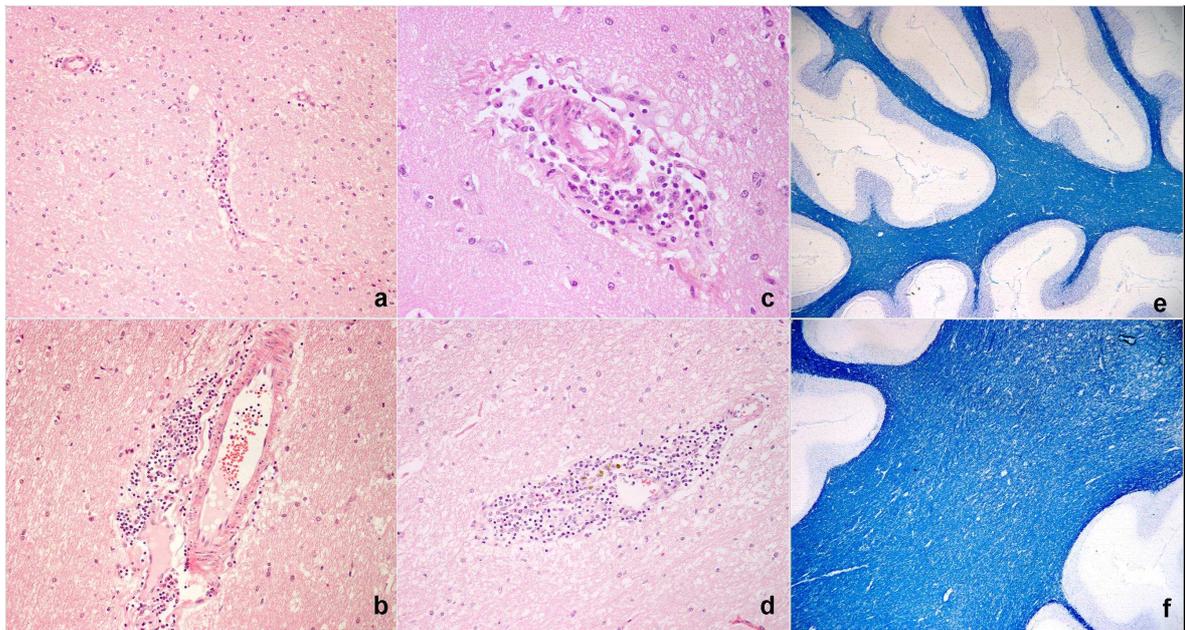


Fig. 2. Di particolare interesse il riscontro di contestuali lesioni di encefalite (a-b) e di leucocerebellite non purulente multifocali (c-d). Le lesioni coinvolgevano soprattutto la sostanza bianca cerebellare, nel cui contesto si osservava la presenza di numerosi manicotti perivascolari costituiti da elementi linfoplasmacellulari ed istiocitari (c-d), talvolta associati al deposito di discreti accumuli di emosiderina (d), ma senza apparente demielinizzazione (e-f). Sezioni colorate con ematossilina-eosina (a-d) e Luxol Fast Blue (e-f).

A CASE OF EQUINE INFECTIOUS ANEMIA WITH SIMULTANEOUS INVOLVEMENT OF THE BRAIN TISSUE IN A HORSE

Equine infectious anemia (EIA) is a lentiviral disease of equids, which has been increasingly reported among Italian horses in the last years.

We report herein a spontaneous case of EIA in a male adult horse, with simultaneous brain tissue involvement.

Post-mortem examination revealed the following changes: subcutaneous oedema, serosal splanchnic effusions, mild hepato-splenomegaly, diffuse lymph node hyperplasia, bilateral nephropathy, single subpleural petechiae.

The main microscopic lesions were: non-purulent interstitial hepatitis and hyperplastic splenitis with prominent haemosiderosis; hyperplastic lymphadenitis; interstitial nephritis, membrano-proliferative and mesangial proliferative glomerulonephritis with prominent haemosiderosis; interstitial non-purulent myocarditis. A non-suppurative, multifocal encephalitis and leukocerebellitis were also observed, with concurrent haemosiderosis, but with no apparent myelin loss.

Despite the documented EIA virus (EIAV) neurotropism, there are few reports of central nervous system (CNS) involvement during infection. It has been estimated that approximately 2% of seropositive horses are affected with CNS lesions, although similar alterations have not been reported before, to the best of our knowledge, within the Italian equine population.

Finally, EIAV neurotropism supports the relevance of such infection also in the differential diagnosis of equine neuropathies, along with the usefulness of this animal model in comparative studies addressing HIV neuropathogenesis.

Key words: horse, equine infectious anemia, viral encephalitides, differential diagnosis, comparative pathology

ADENOCARCINOMA DEL GROSSO INTESTINO CON METAPLASIA OSSEA IN UN PONY

Morini Maria*, **Spadari Alessandro^o**, **Dondi Francesco^o**, **Romagnoli Noemi^o**, **Bettini Giuliano***

**Servizio di Anatomia Patologica, Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, ^oDipartimento Clinico Veterinario; Facoltà di Medicina Veterinaria - Alma Mater Studiorum, Università di Bologna*

Le neoplasie del tratto gastrointestinale del cavallo sono poco frequenti e più spesso rappresentate da linfomi intestinali e carcinomi squamosi dello stomaco, mentre gli adenocarcinomi sono decisamente di più raro riscontro. Oggetto di questa segnalazione è la descrizione di un caso di adenocarcinoma acinare del colon con metaplasia ossea in un pony femmina di 17 anni capitato alla nostra osservazione. Il soggetto era stato sottoposto a celiotomia ventrale mediana da cui era stato possibile individuare la presenza di una neoformazione intraluminale pedunculata cavolfioriforme a carico del colon ventrale. L'esame istologico della massa evidenziava cordoni di cellule epiteliali organizzate in formazioni simil-ghiandolari irregolari, talora ripiene di detriti necrotici, attorniate da una marcata desmoplasia stromale frammista a sottili e irregolari trabecole ossee e sostanza osteoide. Ulteriori sezioni sono state sottoposte ad indagini istochimiche ed immunoistochimiche.

Parole chiave: adenocarcinoma, intestino, cavallo, metaplasia ossea

INTRODUZIONE

Le neoplasie del tratto gastrointestinale del cavallo sono poco frequenti e più spesso rappresentate da linfomi intestinali e carcinomi squamosi dello stomaco. Gli adenocarcinomi sono decisamente più rari, e ne è riferita, come nell'uomo e nel cane, una frequenza relativamente maggiore nel grosso intestino.³ Tuttavia, un recente studio segnala il prevalente coinvolgimento del piccolo intestino in 9 carcinomi intestinali su 11.¹³ Tra i pochi casi descritti dettagliatamente, in tre casi di adenocarcinoma del grosso intestino di soggetti anziani era riferita la presenza di aree di metaplasia ossea.^{6,11} Oggetto di questa segnalazione è la descrizione di un caso di adenocarcinoma acinare del cieco con metaplasia ossea in un pony femmina di 17 anni capitato alla nostra osservazione.

DESCRIZIONE DEL CASO

Il soggetto manifestava episodi intermittenti di dolorabilità addominale e melena da circa sei mesi, e gli esami ematobiochimici avevano rilevato una grave anemia (Hct: 20%) con carenza di ferro. All'esplorazione rettale si palpava una massa di consistenza soda, non poltacea, che dava l'impressione di essere parzialmente in continuità con una struttura anatomica e localizzata all'interno di un organo cavo. L'ecografia dell'addome evidenziava un'area di circa 6 cm di diametro ad ecostruttura disomogenea, vascolarizzata, riferibile a una massa occupante spazio in mesentere, fra colon ventrale destro e corpo del cieco (Fig. 1a). La celiotomia ventrale mediana rilevava nel corpo del cieco, nei pressi dell'orifizio cieco-colico, una massa pedunculata intraluminale di circa 7 cm di diametro nel suo asse maggiore (Fig. 1b). Data l'inaccessibilità anatomica (cieco prossimale, che risulta non esteriorizzabile ma solo raggiungibile con la palpazione) ed il rischio di sepsi, la massa era recisa con taxis manuale esterna, cui seguiva tiftomia apicale ventrale per l'asportazione dei frammenti tumorali (Figs. 1c, 1d, 1e).

MATERIALI & METODI, RISULTATI

Campioni dalla massa erano improntati su vetrino per un esame citologico estemporaneo e fissati per l'istologia in formalina tamponata al 10%. L'esame citologico mostrava abbondanti detriti

necrotici, granulociti neutrofili autolitici, occasionali gruppi di cellule epiteliali prismatiche con moderate atipie cellulari ed isolate voluminose cellule epiteliali con nuclei tondeggianti e nucleoli multipli e ben evidenti (Fig. 2a). L'esame istologico, previa processazione del materiale come di routine e colorazione con ematossilina-eosina, evidenziava cordoni di cellule epiteliali disposte in formazioni simil-ghiandolari irregolari, talora ripiene di detriti necrotici, attorniate da marcata desmoplasia frammista a sottili e irregolari trabecole ossee e sostanza osteoide. A forte ingrandimento le cellule mostravano forma da colonnare a cuboidale, citoplasma debolmente basofilo, nuclei voluminosi e ovoidali, rare figure mitotiche (Fig. 2b). Non erano evidenti aspetti di invasione di vasi linfatici o ematici. Sulla base di questi rilievi era emessa una diagnosi di adenocarcinoma acinare con metaplasia ossea.

Ulteriori sezioni erano sottoposte a studio istochimico (PAS, Tricromica di Masson, Alizarina-S) (Figs. 2c, 2d, 2e) ed immunoistochimico (Tab. 2; Fig. 3), che confermava la natura epiteliale del processo neoplastico (positività alla CKAE1/AE3) e la presenza di osteoide e matrice ossea (positività all'Alizarina-S). La valutazione immunoistochimica della positività nucleare delle cellule epiteliali all'antigene Ki67 attestava una elevata attività proliferativa (indice MIB-1, espresso in percentuale di nuclei positivi sul totale, pari al 40%).

Il pony, dopo radiografia al torace che aveva escluso un coinvolgimento metastatico polmonare, era dimesso ad una settimana dalla chirurgia. A sei mesi dall'intervento il soggetto era ancora in vita, ma con una sintomatologia addominale che faceva fortemente sospettare la presenza di una recidiva locale. Il proprietario non ha consentito ulteriori indagini.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I carcinomi intestinali sono piuttosto rari nel cavallo, e per lo più rappresentati in letteratura da sporadiche segnalazioni di singoli casi (Tab. 1). La peculiare presenza di aree multifocali di metaplasia ossea osservata in questo caso è stata riportata come evento inusuale in carcinomi gastrointestinali di uomo,^{2,5,8} gatto e ovino,^{3,9} e anche in tre carcinomi intestinali di cavallo.^{6,11} La formazione di osso eterotopico è un processo complesso, il cui meccanismo non è ancora

completamente conosciuto. Accanto all'ipotesi storica della trasformazione in osteoblasti delle cellule carcinomatose, il meccanismo attualmente più accreditato fa riferimento alla metaplasia del connettivo stromale della neoplasia.^{2,5,8} In particolare, studi recenti hanno evidenziato in carcinomi intestinali dell'uomo con metaplasia ossea la sovraespressione di BMPs (Bone Morphogenic Proteins), glicoproteine appartenenti alla superfamiglia del TGF- β il cui legame ad appropriati recettori determina la differenziazione di cellule staminali mesenchimali in osteoblasti, la produzione di matrice osteoide ed in definitiva la produzione di tessuto osseo (BMP-2, BMP-4, BMP-5, BMP-6).^{5,8} Nell'uomo la metaplasia ossea dei carcinomi intestinali non influenza la malignità della neoplasia. Nel caso presentato non erano presenti metastasi alla diagnosi, ed il sospetto di recidiva alcuni mesi dopo l'intervento.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Fulton IC, Brown CM, Yamini B. Adenocarcinoma of intestinal origin in a horse: diagnosis by abdominocentesis and laparoscopy. *Equine Vet J* 1990; 22: 447-448.
- (2) Groisman GM, Benkov KJ, Adsday V, Dische MR. Osseous metaplasia in benign colorectal polyps. *Archiv Pathol Lab Med* 1994; 118: 64-65.
- (3) Head KW, Cullen JM, Dubielzig RR, Else RW, Misdorp W et al. *Histological Classification of Tumors of the Alimentary System of Domestic Animals. Second Series, Vol X.* WHO, Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC, 2003.
- (4) Honnas CM, Snyder JR, Olander HJ, Wheat JD. Small intestinal adenocarcinoma in a horse. *JAVMA* 1987; 191: 845-846.
- (5) Imai N, Iwai A, Hatakeyama S et al. Expression of bone morphogenetic proteins in colon carcinoma with heterotopic ossification. *Pathol Internat* 2001; 51: 643-648.
- (6) Kirchhof N, Steinhauer D, Fey K. Equine adenocarcinomas of the large intestine with osseous metaplasia. *J Comp Pathol* 1996; 114: 451-456.
- (7) Kiupel M, Van Alstine WG, Ritmeester A. Small intestinal adenocarcinoma in a horse. *Eur J Vet Pathol* 1998; 4: 39-42.
- (8) Kypson AP, Morphew E, Jones R et al. Heterotopic ossification in rectal cancer: rare finding with a novel proposed mechanism. *J Surg Oncol* 2003; 82: 132-136.
- (9) Meuten DJ. *Tumors in Domestic Animals.* 4th edit. Ames: Iowa State Press, 2002.
- (10) Moran JA, Lemberger K, Cadoré JL, Lepage OM. Small intestine adenocarcinoma in conjunction with multiple adenomas causing acute colic in a horse. *J Vet Diagn Invest* 2008; 20: 121-124.
- (11) Rootman JB, Malcom CR, Cullen JM. Colonic adenocarcinoma with osseous metaplasia in a horse. *JAVMA* 1991; 198: 657-659.
- (12) Spoormarkers TJP, Ijzer J, Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan MM. Neurological signs in a horse due to metastases of an intestinal adenocarcinoma. *Vet Quart* 2001; 23: 49-50.
- (13) Taylor SD, Pusterla N, Vaughan B, Whitcomb MB, Wilson WD. Intestinal neoplasia in horses. *J Vet Inter Med* 2006; 1429-1436.



Figura 1. (a) Immagine ecografica della neof ormazione intraaddominale (i cui margini sono segnalati dalle quattro frecce bianche). (b) Esteriorizzazione chirurgica del cieco, in cui è isolata la porzione interessata dal processo. (c) Incisura chirurgica all'apice ventrale del colon da cui sono stati asportati tutti i frammenti (d) della neof ormazione intraluminale. (e) Aspetto macroscopico in sezione di uno dei frammenti di maggiori dimensioni.

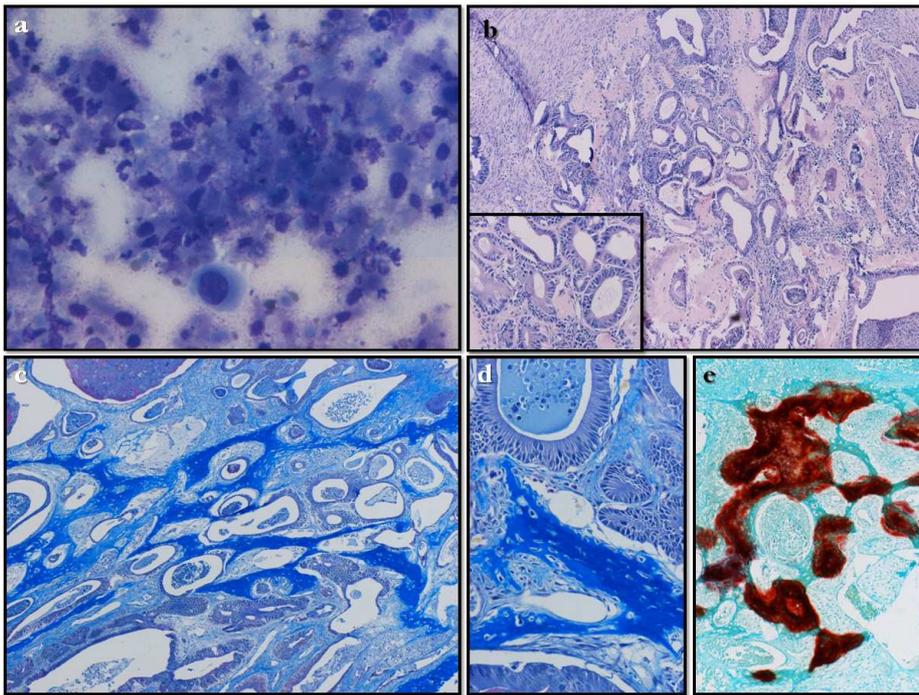


Figura 2. (a) Il campione citologico dal pezzo chirurgico presenta abbondanti detriti necrotici ed una voluminosa cellula epiteliale con marcate atipie nucleari e nucleolari. DQ, 20x. (b) L'esame istologico mostra, a piccolo ingrandimento, la presenza di cordoni di cellule epiteliali disposte in formazioni similglandolari irregolari, attorniate da marcata desmoplasia frammista a sottili e irregolari trabecole ossee e sostanza osteoide (EE, 10x). A forte ingrandimento, gli aggregati epiteliali

appaiono composti da cellule di forma da colonnare a cuboidale, citoplasma debolmente basofilo, nuclei voluminosi e ovoidali (inserto, EE, 20x). Le trabecole ossee e la sostanza osteoide sono evidenziabili in blu intenso con la Tricromica di Masson (c,d, 10x e 20x) ed in rosso con Alizarina-S (e, 20x).

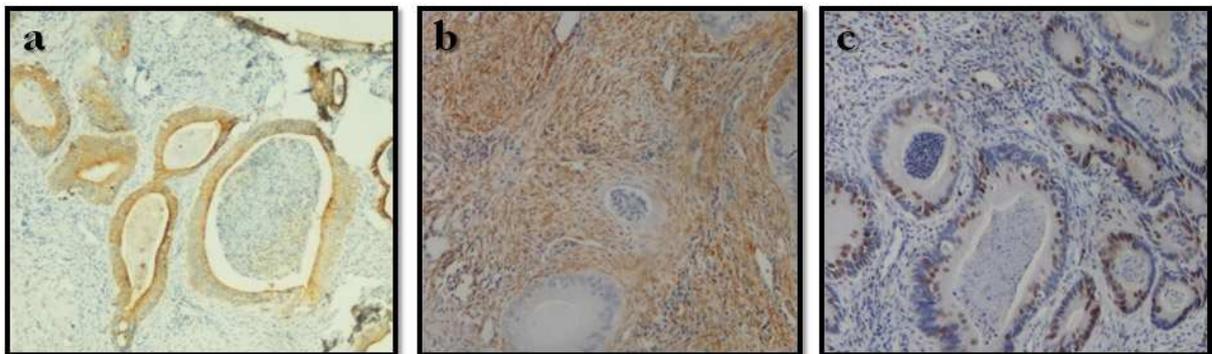


Figura 3. I risultati delle prove immunoistochimiche evidenziano una intensa positività della componente epiteliale alle citocheratine ad ampio spettro molecolare (CKAE1/AE3) (a, 20x), ed una diffusa ed intensa positività della componente desmoplastica stromale a Vimentina (b, 20x). Sono inoltre numerosi i nuclei delle cellule neoplastiche positivi al MIB-1 (c, 20x).

Autori	Razza	Sesso	Età	Sede anatomica	Metaplasia ossea	Decorso	Metastasi
Honnas et al., 1987 ⁴	Arabo/American Saddlebred	F	21 anni	Digiuno	No	Vivo a 13 mesi dalla chirurgia	Non apparenti
Fulton et al., 1990 ¹	Quarterhorse	F	11 anni	Intestino	No	Eutanasia	Omento, sierosa di fegato, milza e diaframma
Röttman et al., 1991 ¹¹	Mezzosangue	F	30 anni	Giunzione colon dorsale destro e colon trasverso	Si	Eutanasia	Fegato
Kirchhof et al., 1996 ⁶	Mezzosangue	MC	15 anni	Cieco	Si	Eutanasia	Non presenti
	Haflinger	F	9 anni	Colon dorsale sinistro	Si	Eutanasia	Non presenti
Kiupel et al., 1998 ⁷	Arabo/Quarterhorse	MC	8 anni	Duodeno	No	Eutanasia	Fegato, milza, omento e diaframma
Spoornmaker et al., 2001 ¹²	Dutch Warmblood	F	22 anni	Cieco	No	Eutanasia	Linfonodi meseraici e lombari, midollo spinale
Moran et al., 2008 ¹⁰	Andaluso	M	11 anni	Digiuno	No	Vivo a 12 mesi dalla chirurgia	Non apparenti

Tabella 1. Rassegna bibliografica dei casi di adenocarcinoma intestinale di cavallo descritti in letteratura.

Anticorpi	Epitelio	Stroma
CK AE1/AE3	+	-
CK14	-	-
CK19	-	-
Vimentina	-	+
Actina	-	+
Desmina	-	-
S-100	-	-
CD117	-	-
Beta-catenina	-	-
Cromogranina A	-	-
Ki67 (indice MIB-1)	40%	5%

Tabella 2. Risultati delle prove immunoistochimiche effettuate.



LARGE INTESTINAL ADENOCARCINOMA WITH OSSEOUS METAPLASIA IN A PONY

Neoplasm of the gastrointestinal tract are uncommon in horses, and mostly represented by gastric squamous cell carcinoma and alimentary lymphoma, while intestinal adenocarcinomas are very rare. A case of large intestine acinar adenocarcinoma with osseous metaplasia in a 17-year-old female pony is described. A firm, whitish-gray, colonic cauliflower-like mass was found at exploratory celiotomy and surgically excised. Histopathology showed a neoplastic tissue composed of well-differentiated cords of single-layered columnar to cuboidal epithelial cells with well-formed bony spicules and osteoid in the fibrovascular stroma. Histochemical and immunohistochemical investigations were also performed.

Key words: adenocarcinoma, intestine, horse, osseous metaplasia

NEFROPATIA GIOVANILE IN UN CANE YORKSHIRE TERRIER: ESAME ISTOLOGICO ED ULTRASTRUTTURALE

Palmieri Chiara, Aste Giovanni¹, Boari Andrea¹, Della Salda Leonardo

Sezione di Patologia Generale ed Anatomia Patologica Veterinaria, Dip. Scienze Biomediche Comparate, ¹Dip. Scienze Cliniche Veterinarie, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Teramo

Le patologie renali familiari causa di insufficienza renale sono state descritte in diverse razze canine e comprendono agenesie, ipoplasie, displasie, glomerulopatie, nefropatie tubulointerstiziali e disfunzioni del trasporto tubulare. Nel presente lavoro è descritto un caso di nefropatia giovanile in un cane Yorkshire Terrier di 4 mesi con sospetto clinico di displasia renale bilaterale congenita.

All'esame istologico si osserva un aumento del numero di glomeruli fetali nella corticale, rari glomeruli immaturi, atrofia cistica glomerulare, occasionale sclerosi e lipidosi glomerulare, cristalli intratubulari, proliferazione multifocale delle arteriole nella corticale, rara dilatazione cistica tubulare, lieve fibrosi interstiziale, evidenziata anche dalla colorazione tricromica di Masson. L'analisi morfometrica mostra una notevole riduzione del numero di glomeruli maturi ed un'elevata percentuale di glomeruli fetali in entrambi i reni rispetto ai controlli. Con la colorazione PAS e l'analisi delle sezioni semifini (500 nm) colorate con il blu di toluidina si evidenzia un ispessimento della capsula di Bowman e della matrice mesangiale. All'esame ultrastrutturale, la membrana basale glomerulare appare ispessita e multilaminare con uno spessore pari a 700 ± 76.7 nm (vs. 256.2 ± 43.4 nm dei controlli) (metodo dell'intercetta ortogonale). Il ridotto numero di glomeruli maturi, l'elevata percentuale di glomeruli fetali e la presenza di rari glomeruli immaturi indicano un arresto del normale sviluppo renale (nefropatia giovanile), in assenza di caratteri tipici di displasia renale. Un reperto interessante è rappresentato dalle anomalie della membrana basale glomerulare, descritte anche nella sindrome di Alport dell'uomo, nella glomerulopatia ereditaria del Samoyedo, nelle nefriti ereditarie del Bull terrier e Cocker spaniel inglese, nelle glomerulonefropatie familiari di diverse razze canine, nel topo ICGN con sindrome nefrosica ereditaria.

Parole chiave: nefropatia, displasia, membrana basale glomerulare, rene, cane

JUVENILE NEPHROPATHY IN A YORKSHIRE TERRIER DOG: HISTOLOGIC AND ULTRASTRUCTURAL STUDIES

Familial renal diseases resulting in renal failure have been reported in several breeds of dogs and include agenesis, hypoplasia, dysplasia, glomerulopathy, tubulointerstitial nephropathy and tubular transport dysfunction. We describe a case of juvenile nephropathy in a 5 month-old male Yorkshire terrier in which a congenital bilateral renal dysplasia is suspected. Histologically, there are increased number of fetal glomeruli, rare immature glomeruli, glomerular cystic atrophy, rare glomerular sclerosis and lipidosis, intratubular crystals, multifocal proliferation of arterioles, rare tubular cystic dilation, mild diffuse interstitial fibrosis. By means of morphometry, a marked reduction in mature glomeruli number and an increased percentage of fetal glomeruli compared to age-matched controls are detected. PAS staining and semithin sections analysis reveal thickening of Bowman's capsule and mesangial matrix. Glomerular basement membrane (GBM) is thickened (700 ± 76.7 nm vs. 256.2 ± 43.4 of controls) and multilaminar. The reduced number of mature glomeruli, the prevalence of fetal glomeruli and rare immature glomeruli suggest a renal developmental arrest (juvenile nephropathy), without typical features of renal dysplasia. Interesting findings are the abnormalities of GBM, described also in human Alport syndrome, Samoyed hereditary glomerulopathy, Bull terrier and English Cocker spaniel hereditary nephritis, familial glomerulonephropathies of other dog breeds and hereditary nephrotic mice (ICGN strain).

Key words: nephropathy, dysplasia, glomerular basement membrane, kidney, dog

QUADRI ANATOMOPATOLOGICI RENALI IN TIGRI (*PANTHERA TIGRIS*) IN UN GIARDINO ZOOLOGICO ITALIANO

Pascotto Ernesto¹, Codolo Roberta¹, Guadagnini Davide², Magnone William²,
Sandri Camillo², Galeotti Marco¹

¹ Dipartimento di Scienze Animali, Università di Udine, Facoltà di Medicina Veterinaria

² Parco Natura Viva – Garda Zoological Park, Bussolengo (VR)

L'11 febbraio 2006, presso il Parco Zoo Natura Viva di Bussolengo (VR), una femmina di *Panthera tigris* di 7 anni (caso 1), moriva improvvisamente senza manifestare sintomi apparenti. Due settimane dopo un'altra femmina, di 15 anni (caso 2), mostrava sintomi di anoressia, apatia, dimagrimento rapido e veniva trovata morta l'11 aprile. Il 28 ottobre dello stesso anno e il primo aprile 2007 morivano altri due soggetti, maschi, di 15 e 16 anni (casi 3 e 4).

Gli approfondimenti necroscopici evidenziavano, a carico di tutti i soggetti, gravi nefropatie che, nelle due femmine (casi 1 e 2), apparivano primariamente responsabili della morte.

I casi 1 e 3 presentavano glomerulo e tubulo nefrosi associate a nefrosclerosi. Nel caso 2 si riscontrava, a livello del bacinetto renale, un grosso calcolo a stampo, che coinvolgeva anche tutti i calici minori, costituito da cristalli di struvite. Il parenchima renale mostrava, in questo soggetto, gravi processi di fibrosi e, a livello tubulare, necrosi multifocale e grave steatosi. Nel quarto caso, si osservava importante nefrosclerosi associata a discreto infiltrato interstiziale multifocale, delineando una possibile nefrite cronica interstiziale.

La letteratura descrive frequentemente patologie renali a carico di carnivori anziani, tuttavia le informazioni sui grandi felini appaiono piuttosto carenti e contraddittorie. Le nefropatie segnalate nel presente studio differiscono dalle descrizioni riportate in letteratura su *Panthera tigris*.

I quadri nefrosici riscontrati nei casi 1 e 3 appaiono sovrapponibili a lesioni descritte, in altre specie, in seguito ad errori dietetici (la carenza di quote connettivali e viscerali è tipica delle diete in cattività nelle tigri). Le nefrolitiasi con calcoli di struvite (caso 2) sono spesso considerate, nell'uomo, legate ad infezioni del tratto urinario. Nefriti tubulo interstiziali croniche come nel caso 4, invece, sono segnalate come possibile esito di infezioni batteriche (spesso associate a *Leptospira* spp. in cane e suino). Per ovvi motivi clinici, il ruolo di una eventuale ipertensione cronica, sospettata nei casi 1 e 4, non può essere ponderato.

Le ipotesi eziologiche avanzate suggeriscono approfondimenti sierologici ed urinoculturali in tutti i casi con sintomatologia sospetta.

Parole chiave: *Panthera tigris*, reni, nefropatie, nefrite, urolitiasi

SEGNALAMENTO, ANAMNESI E SINTOMATOLOGIA

L'11 febbraio 2006, presso il Parco Zoo Natura Viva di Bussolengo (VR), una femmina di *Panthera tigris* di 7 anni (caso 1), moriva improvvisamente senza manifestare sintomi apparenti, ad eccezione di valori ematici elevati di creatinina (CREA > 8 MG/DL) riscontrati in un controllo del mese precedente. A poche settimane di distanza un'altra femmina, di 15 anni (caso 2), mostrava sintomi di anoressia, apatia, dimagrimento rapido e veniva trovata morta, dopo 15 giorni, l'11 aprile 2006.

Il 28 ottobre dello stesso anno e il primo aprile 2007 morivano altri due soggetti, maschi, di 15 e 16 anni (casi 3 e 4).

ANATOMIA PATOLOGICA

Tutti i soggetti (n.4) analizzati in questo studio presentavano quadri di nefropatia. In due casi (caso 1 e caso 2), le lesioni renali, apparivano, sotto il profilo anatomopatologico, primariamente responsabili della morte.

Caso 1

L'esame necroscopico ed i successivi esami istologici relativi al caso 1, evidenziavano oltre ad una discreta tiiflite cronica, un importante quadro di nefropatia.

Macroscopicamente i reni evidenziavano un forte ispessimento della capsula, una colorazione pallida bruno-verdastra e si presentavano di volume moderatamente diminuito con superficie lievemente bernoccoluta. La corticale appariva atrofica con quadri di fibrosi multifocale. La midollare appariva congesta. Nel bacinetto si osservavano frustoli di materiale giallo-verdastro, stopposo-piumoso.

All'esame istologico veniva rilevato un quadro renale complessivo di nefrosi (glomerulo e tubulo nefrosi) con nefrosclerosi. Particolarmente evidenti apparivano i fenomeni di sofferenza tubulare che talora sfociavano in necrosi tubulare.

Caso 2

L'esame necroscopico del caso 2 evidenziava primariamente importanti lesioni renali associate a enfisema polmonare di grave entità.

I reni apparivano di diverso volume. Nel più piccolo, dopo scapsulamento, la superficie appariva bruno-verdastro e mostrava aree biancastre traslucide coalescenti. In sezione si

notava notevole atrofia della corticale e sclerosi multifocale. La midollare era congesta ed emorragica. A livello del bacinetto renale si rilevava grosso calcolo a stampo, biancastro gessoso non stratificato coinvolgente tutto il bacinetto e tutti i calici minori che all'analisi chimica risultava costituito da cristalli di struvite. Il rene controlaterale mostrava una modesta ipertrofia compensativa e presentava alcuni calcoli di più piccola dimensione a livello del bacinetto.

All'esame istologico il parenchima renale presentava gravi processi di fibrosi e di sofferenza tubulare (necrosi tubulare multifocale e grave steatosi).

Caso 3

Nel terzo caso, l'esame necroscopico evidenziava un quadro anatomopatologico sistemico con lesioni dominanti in sede cardio-polmonare (sfiancamento cardiaco con valvulite cronica, edema polmonare grave con discreta antracosi) e renale.

I reni apparivano moderatamente megalici, con capsula inspessita. Dopo scapsulamento, reso difficoltoso dalla presenza di adesioni, essi mostravano colorazione arancio-verdastra e si notava una intensa tramatura connettivale su base vascolare. Particolarmente evidenti apparivano i piccoli vasi subcapsulari. Al taglio la corticale evidenziava striature ed aree coniche soffuse multifocali biancastre. Nel bacinetto erano presenti frustoli di materiale giallo-verdastro stopposo-piumoso.

In particolare l'esame istologico evidenziava importante nefrosclerosi associata ad un discreto infiltrato interstiziale multifocale, delineando un possibile quadro di cronicizzazione di nefrite (nefrite cronica interstiziale) aggravata da scompenso cardiaco.

Caso 4

L'esame necroscopico del caso 4 evidenziava un quadro anatomopatologico sistemico complesso, dove dominavano lesioni polmonari (bronchite/bronchiolite) subacuta con tendenza al tipo purulento; enfisema multifocale di elevata entità ed una nefropatia grave. Quest'ultima appariva simile al caso 1, dimostrandosi di carattere nefrosico, con una sostituzione fibrosa dell'organo (nefrosclerosi) più marcata. A livello del bacinetto renale si osservano frustoli di materiale giallo-verdastro stopposo-piumoso. Da

segnalare la presenza di un discreto infiltrato linfoplasmacellulare interstiziale.

DISCUSSIONE

Anche se la letteratura veterinaria descrive come frequenti alcune patologie renali nei carnivori anziani (Marcato 2002), le informazioni sui grandi felini appaiono piuttosto carenti e contraddittorie. Inoltre si sottolinea come il primo soggetto sia deceduto a soli 7 anni.

Nella tabella sono riportati i quadri anatomopatologici renali riscontrati in *Panthera tigris* secondo la bibliografia.

Per quanto riguarda altri grandi felini, sono segnalati casi di necrosi papillare renale in *Panthera leo* (Corpa *et al.*, 2005), glomerulosclerosi in *Acinonyx jubatus* (Munson *et al.*, 2005), amiloidosi renale in *Acinonyx jubatus* e *Panthera leo* (Munson *et al.*, 2005; Williams *et al.*, 2005) e nefrosi da ossalati in *Panthera pardus* e *Puma concolor* (Stoskopf *et al.*, 1979). Da segnalare infine la notevole frequenza di glomerulonefriti (26 casi su 27 necroscopie effettuate) riscontrate da Jiménez *et al.* (2008), in *Lynx pardinus* sia in natura che in cattività.

Sotto il profilo eziologico i casi segnalati nel presente studio, pur non portando a conclusioni definitive, consentono di avanzare alcune ipotesi.

Quadri nefrosici simili a quelli riscontrati nei casi 1 e 4 appaiono sovrapponibili a lesioni rilevate, in altre specie, in seguito ad errori dietetici (Bolton e Muson 1999; Bertani *et al.*, 1989; Brenner 1982). Interessante rilevare come Bolton e Muson (1999) segnalino frequenti casi di glomerulosclerosi in ghepardi ipotizzando possibili legami con la dieta e fattori genetici. La dieta delle tigri in cattività (anche nei soggetti esaminati nel presente studio) tende a discostarsi da quella di soggetti in natura, soprattutto perché carente di quote connettivali e viscerali.

Nefriti tubulo interstiziali croniche (caso 3) sono segnalate come possibile esito di infezioni batteriche ed in particolare nel cane e nel suino sono sovente associate alla presenza di *Leptospira* spp. Infezioni da *Leptospira* spp. vengono descritte nei grandi felini in cattività (Lilenbaum *et al.*, 2004; Luna *et al.*, 1996).

Infine, le nefrolitiasi con calcoli di struvite (come nel caso 2), nell'uomo e nel cane, sono considerate sovente legate ad infezioni del tratto urinario ad opera di batteri (*Proteus* e stafilococchi) (Griffith 1978; Cotran *et al.*, 1992; Ling *et al.*, 1998).

CONCLUSIONI

Le nefropatie segnalate nel presente studio differiscono da quelle riportate in letteratura su *Panthera tigris*. Le ipotesi eziologiche avanzate suggeriscono approfondimenti sierologici ed urinoculturali in tutti i casi di tigri mantenute in cattività con sintomatologia sospetta.

RINGRAZIAMENTI

Gli autori desiderano ringraziare il Prof. Giuliano Bettini per la consulenza nell'identificazione della composizione del calcolo relativo al caso 2, ed il Prof. Carlo Alberto Beltrami per gli spunti diagnostici suggeriti. Infine si ringrazia il personale tecnico del laboratorio della Sezione di Biologia e Patologia Animale dell'Università di Udine, in particolare Carla Calligaro e Pierluigi Bagatella, per le colorazioni istologiche eseguite.

BIBLIOGRAFIA

- Bertani T., Zoja C., Abbate M., Rossini M., Remuzzi G. 1989. Age-related nephropathy and proteinuria in rats with intact kidneys exposed to diets with different protein content. *Laboratory investigation - a journal of technical methods and pathology*, 60(2):196-204.
- Bolton L.A., Munson L., 1999. Glomerulosclerosis in captive cheetahs (*Acinonyx jubatus*). *Veterinary Pathology*, 36(1):14-22.
- Brenner B.M., Meyer T.W., Hostetter T.H. 1982. Dietary protein intake and the progressive nature of kidney disease: the role of hemodynamically mediated glomerular injury in the pathogenesis of progressive glomerular sclerosis in aging, renal ablation, and intrinsic renal disease. *The New England Journal of Medicine*, 307(11):652-9.
- Corpa J.M., Marín S., Bolea R., Ortega J., Peris B., Pérez V. 2003. Urolithiasis in two lions. *Veterinary record*, 153(25):786-7.
- Corpa J.M., Marín S., Peris B., Bolea R., Ortega J., Martínez J., Segura P., Pérez V. 2005. Renal papillary necrosis associated with dehydration in large cats. *Veterinary record*, 157: 814-816.
- Cotran R.S., Kumar V., Robbins S.L. 1992. Robbins. *Le Basi Patologiche delle Malattie*. Piccin Nuova Libreria S.p.A. Padova.
- de Bruin A., Wack R., Weisbrode SE. 2005. Persistent metanephric ducts in a geriatric white tiger. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 17:91-93.
- Eulenberger K. 1981. Assay of creatinine concentration in blood serum. Importance for

- early diagnosis of renal functional disorders in zoo animals, particularly *Felidae*. Erkrankungen der Zootiere. Verhandlungsbericht des XXIII. Internationalen Symposiums über die Erkrankungen der Zootiere, 24-28 Juni, 1981, in Halle/Saale, pp. 327-335.
- Gajendragad M.R., Renukaprasad C. Gopalakrishna S., Basavarajappa K., Gowda R.N.S. 2004. A case of hydronephrosis in a tiger. *Indian Journal of Veterinary Pathology*, 28(2):145.
- Griffith D.P. 1978. Struvite stones. *Kidney International*, 13:372-382.
- Helmick K.E., Koplos P., Raymond J. 2006. Disseminated coccidioidomycosis in a captive indochinese tiger (*Panthera tigris corbetti*) with chronic renal disease. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 37(4):542-54.
- Jee H, Pakhrin B., Bae I.H., Shin N.S., Lee S.I., Yoo H.S., Kim D.Y. 2007. Pyelonephritis associated with *Staphylococcus intermedius* in a Siberian tiger (*Panthera tigris altaica*). *Journal of Veterinary Medical Science*, 69(8):851-852.
- Jiménez A., Sánchez B., Pérez Alenza D., García P., López J.V., Rodríguez A., Muñoz A., Martínez F., Vargas A., Peña L. 2008. Membranous glomerulonephritis in the Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 121(1-2):34-43.
- Lilenbaum W., Monteiro R.V., Albuquerque C.E., Ristowa P., Fraguasa S., Cardoso V.S., Fedullo L.P.L. 2004. Leptospiral antibodies in wild felines from Rio de Janeiro Zoo, Brazil. *The Veterinary Journal*, 168(2):191-193.
- Ling G.V. et al. 1998. Urolithiasis in dogs. I, II, III, IV, *American Journal of Veterinary Research*, 59:624-660.
- Luna A.M.A., Moles C.L.P., Torres B.J.I., Gual S.F. 1996. Investigación serológica de leptospirosis en fauna silvestre mantenida en cautiverio en el zoológico de Chapultepec de la ciudad de Mexico. *Veterinaria Mexico*, 3:229-234.
- Marcato P.S. 2002. *Patologia sistematica veterinaria*. Edagricole. Bologna.
- McCullagh K.G., Lucke V.M. 1978. Renal papillary necrosis in the tiger. *Acta Zoologica Pathologica, Antverpiensia*, 70:3-13.
- Munson L., Terio K.A., Worley M., Jago M., Bagot-Smith A., Marker L. 2005. Extrinsic factors significantly affect patterns of disease in free-ranging and captive cheetah (*Acinonyx jubatus*) populations. *Journal of Wildlife Diseases*, 41(3):542-548.
- Narayanaswamy H.D., Murthy G.S., Das D.K., Girish B.C. 2006. Ulcerative gastroenteritis due to chronic renal failure in a white tiger. *Indian Veterinary Journal*, 83 (1) 82-83.
- Schulze C., Brüggemann M., Böer M., Brandt H.-P., Pohlenz J., Linke R. 1998. Generalized AA-amyloidosis in Siberian Tigers (*Panthera tigris altaica*) with Predominant Renal Medullary Amyloid Deposition. *Veterinary Pathology*, 35:70-74.
- Stoskopf M.K., Strandberg J.D., Loew F.M., 1979. Renal oxalosis in large felids maintained on a commercial diet. *Annual Proceedings. American Association of Zoo Veterinarians*, 1978, Knoxville, Tennessee. pp. 154-161.
- Williams J.H., Van Wilpe E., Momborg M. 2005. Renal medullary AA amyloidosis, hepatocyte dissociation and multinucleated hepatocytes in a 14-year-old free-ranging lioness (*Panthera leo*). *Journal of the South African Veterinary Association*, 76(2):90-8.
- Wolf D.C., Lenz S.D., Carlton W.W., 1991. Renal papillary necrosis in two domestic cats and a tiger. *Veterinary Pathology*, 28(1):84-87.
- XiuShan W. 1996. Diagnosis of suspected nephritis and pyelonephritis in a tiger. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 22(5):33.

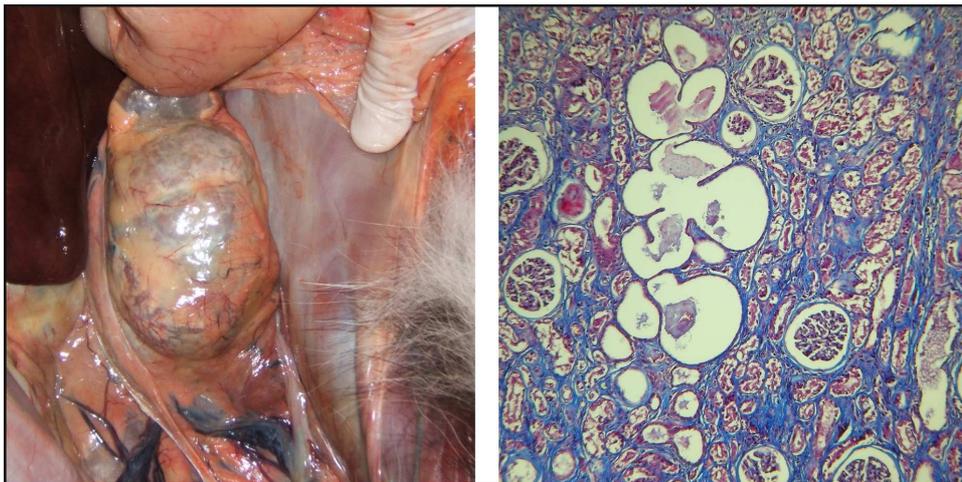


Figura 1. Immagini relative al caso 1. A sinistra: Macroscopiche del rene. A destra: Immagine istologica che evidenzia un'area con marcata ectasia tubulare con contenuto proteinaceo nell'ambito di un parenchima sclerotico. Colorazione Tricromica di Masson.

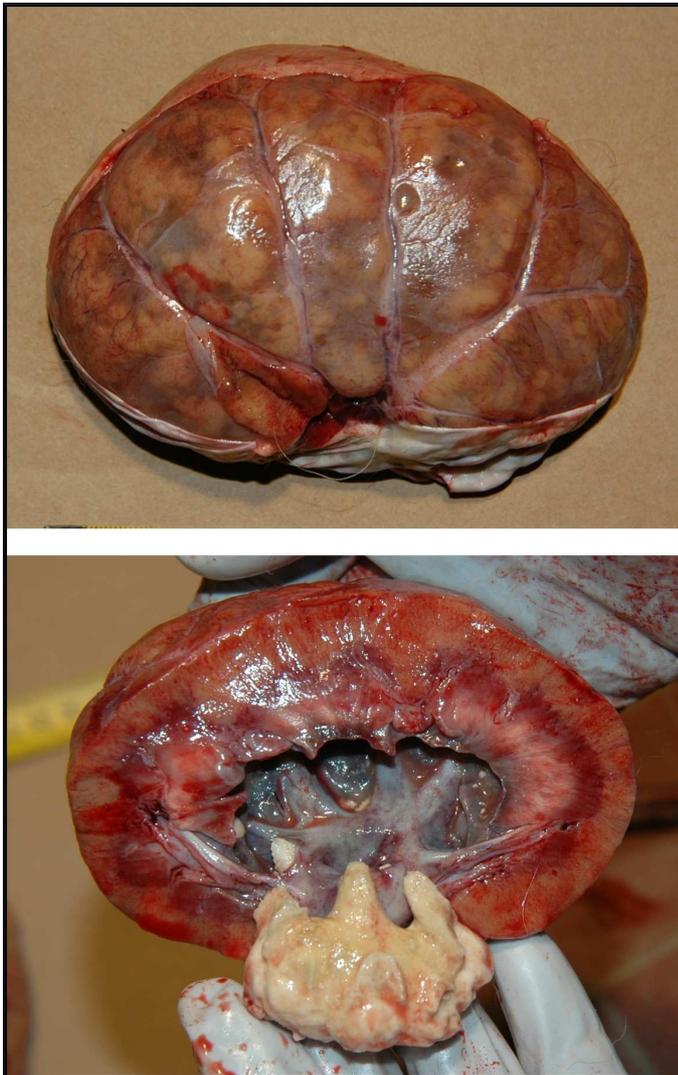


Figura 2. Immagine relativa al caso 2. Macroscopiche di rene con grosso calcolo a stampo.

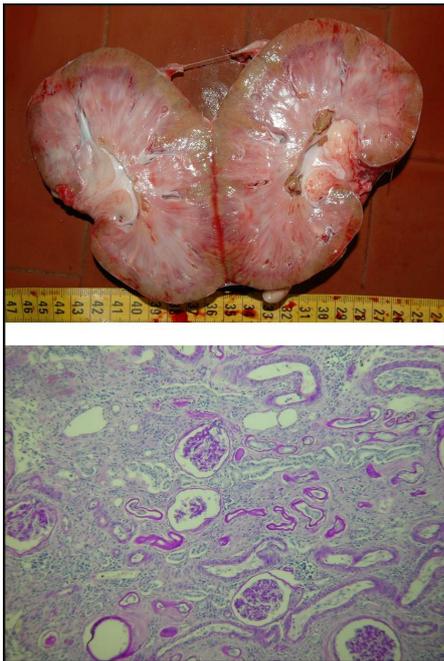


Figura 3. Immagini relative al caso 3. A sinistra: macroscopica di rene con grosso calcolo a stampo. A destra: Immagine istologica del rene con evidente sclerosi tubulare associata ad un diffuso infiltrato parvicellulare, colorazione P.A.S.

QUADRO ANATOMOPATOLOGICO RENALE	N. CASI	ETÀ	CONDIZIONE	LOCALITÀ	FONTE
Displasia renale	1	18 anni	-	-	<i>De Bruin et al., 2005</i>
Idronefrosi	1	-	-	-	<i>Gajendragad et al., 2004</i>
Amiloidosi AA sistemica	4	>10; >10; 3; 3 (anni)	-	a wild animal Park	<i>Schulze et al., 1998</i>
Necrosi papillare renale	1	15 – 20	cattività	Spagna Costablanca Safari Park	<i>Corpa et al., 2005</i>
	1	9 settimane	-	-	<i>Wolf et al., 1991</i>
	2	-	-	-	<i>McCullagh and Lucke 1978</i>
Urolitiasi del bacinetto	1	15 anni	cattività	Italia Parco Natura Viva	Originali
Pielonefrite batterica	1	4 anni	cattività	Corea del Sud Korea National Arboretum	<i>Jee et al., 2007</i>
Nefrite e pielonefrite	1	16 anni	cattività	Cina Beijing Zoo	<i>Wu XiuShan 1996</i>
Nefrite interstiziale cronica	1	14 anni	cattività	India Bannerghatta Biological Park	<i>Narayanaswamy et al., 2006</i>
	1	16 anni	cattività	Italia Parco Natura Viva	Originali
Glomerulopatia cronica associata a coccidioomicosi	1	19 anni	cattività	USA El Paso Zoo	<i>Helmick et al., 2006</i>
Tubulonefrosi - nefrosclerosi	2	7 e 15 anni	cattività	Italia Parco Natura Viva	Originali

Tabella. Quadri anatomopatologici renali descritti in letteratura in *Panthera tigris*.

ANATOMOPATHOLOGICAL ASPECTS OF NEPHROPATHIES IN TIGERS (*PANTHERA TIGRIS*) IN AN ITALIAN ZOO

From February 2006 to April 2007, four tigers (*Panthera tigris*) died at Parco Natura Viva – Garda Zoological Park, Italy. Necropsies of all subjects were performed. Macroscopic and histological exams showed severe nephropathies and in two cases renal lesions are supposed to be the cause of death. Two tigers, a 7 years old female, and a 15 years old male, showed glomerular and tubulonephrosis associated with nephrosclerosis. A 15 years old female showed urolithiasis with a great struvite stone in the renal pelvis, while chronic interstitial nephritis was observed in the last subject (16 years old male).



Kidney diseases are often described in aged Carnivora, but there's a lack of information upon big cats. Lesions described for first two tigers could be related with nutritional mistakes. The other two cases could be related with infections. In humans there is good evidence to link struvite stones (second tiger) to high urinary tract infections. Finally, chronic interstitial nephritis (the last tiger) could be due to bacterial infection (this nephritis is often associated with *Leptospira* spp. infections in dog and swine). Etiological hypothesis, advanced by this study, suggest further serological analysis and urine culture in all cases with suspected symptoms.

Key words: *Panthera tigris*, kidney, nephropathies, nephritis, urolithiosis

UN METODO DI ANALISI DELLA DISTRIBUZIONE TOPOGRAFICA DI LESIONI NODULARI CUTANEE NEL CANE

Pascotto Ernesto¹, Tomè Paolo¹, Zuliani Michel², Comazzi Stefano³, Galeotti Marco¹,

¹*Dipartimento di Scienze Animali, Università degli Studi di Udine, Facoltà di Medicina Veterinaria*

²*Dipartimento di Scienze Agrarie ed Ambientali, Università degli Studi di Udine, Facoltà di*

Agraria. ³*Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica, Università degli Studi di Milano, Facoltà di Medicina Veterinaria*

In letteratura le informazioni riguardanti la distribuzione topografica delle neoplasie cutanee del cane appaiono lacunose e quasi esclusivamente riferite a suddivisioni per aree anatomiche.

Scopo dello studio è quello di sviluppare gli strumenti informatici necessari all'analisi della distribuzione puntiforme delle lesioni nodulari.

Per la registrazione dei dati è stato creato un database (MySQL AB v.5.0) convenientemente parametrizzato. Per l'analisi dettagliata (puntiforme) della distribuzione topografica delle lesioni e per le successive elaborazioni sono stati utilizzati software G.I.S. (Quantum GIS v.1.0.1; gvSIG *Generalitat Valenciana* v.1.1.2) e Sextante *Junta de Extremadura* v.0.15 (algoritmo di interpolazione Density Kernel), applicati ad un modello bidimensionale della superficie cutanea. Come sistema operativo è stato utilizzato Linux (Mandriva Free 2008.0).

Sono stati analizzati n.252 casi di lesioni nodulari cutanee nel cane, afferite al Dip. di Scienze Animali dell'Università di Udine. Di questi, n.200 casi erano forme progressive neoplastiche; n.52 casi erano lesioni nodulari non neoplastiche. Sono state ottenute delle mappe distributive delle lesioni in relazione alla densità di frequenza relativa. Le mappe evidenziano una chiara eterogeneità nella distribuzione delle lesioni con evidenti aree di maggiore densità di frequenza di insorgenza. Le forme neoplastiche benigne e borderline tendono ad insorgere con una frequenza maggiore nel gomito e nell'avambraccio, nella regione orbitale ed auricolare della testa e nella regione perianale; le forme maligne sembrano insorgere più frequentemente nella regione toracica ed addominale media e nella porzione caudale prossimale degli arti posteriori. L'analisi topografica può essere riferita a tutti i parametri registrati nel database (tipo neoplastico, istotipo, dimensione lesioni, morfologia, tempo di insorgenza, etc.).

Il metodo sviluppato in questo studio pilota si dimostra interessante per le possibili applicazioni in dermatologia ed oncologia clinica.

Parole chiave: cane, neoplasie cutanee, topografia, Sistemi Informativi Geografici

A METHOD OF ANALYSIS OF THE TOPOGRAPHICAL DISTRIBUTION OF NODULAR SKIN LESIONS IN DOGS

In the literature, the information about the topographic distribution of the dog skin cancers appear scarce and almost exclusively related to subdivisions to anatomical areas.

The aim of this study is to develop the informatic tools needed to analyse the punctiform distribution of nodular lesions. A database was created in order to record the data (MySQL AB v.5.0). For the detailed analysis (punctiform) of the topographic distribution of lesions, GIS software (Quantum GIS v.1.0.1, gvSIG *Generalitat Valenciana* v.1.1.2) and Sextante *Junta de Extremadura* v.0.15 were used; these software were applied to a bidimensional model of cutaneous surface.

Linux (Mandriva Free 2008.0) was used as operating system.

N. 252 cases of nodular skin lesions in dogs were analysed. Of these, n.200 cases were found to be progressive neoplastic forms, n.52 cases were non-neoplastic nodular lesions.

Distribution maps of the lesions were obtained, in relation to the density of relative frequency. The maps show a clear heterogeneity in the distribution of the lesions with marked areas of increased density of frequency of occurrence.

Benign and borderline neoplastic forms tend to occur with increased frequency in elbow and forearm, in the head and perianal regions; malignant forms tend to occur more frequently in thorax and abdomen regions and in the proximal caudal portion of the rear limbs.

The topographic analysis can be related to every parameter recorded in the database (neoplastic type, histotype, lesion size, morphology, time of onset, etc.).

The method developed in this pilot study proves interesting for possible applications in clinical dermatology and oncology.

Key words: dog, skin neoplasms, topography, Geographic Information System

UN SINGOLARE TUMORE SPINALE A CELLULE GIGANTI IN UN GATTO

Pavone Silvia¹, Pintore Laura², Bernardini Marco³, Mandara Maria Teresa¹

¹Dipartimento di Scienze Biopatologiche ed Igiene delle Produzioni Animali ed Alimentari, Università di Perugia. ²Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata ed Igiene Veterinaria, Università di Padova. ³Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie, Università di Padova

In questo lavoro riportiamo un singolare caso di tumore spinale di un gatto maschio europeo di 6 anni con deficit neurologici progressivi riferibili a localizzazione spinale C1-C5. La RM del rachide cervicotoracico ha messo in evidenza un'area iso-ipointensa al midollo spinale in sequenze pesate in T2, di 0.90x0.80 cm, causa di grave compressione dorsale del midollo spinale in corrispondenza di C4. In corso di exeresi chirurgica la massa appariva extradurale, di facile asportazione e isolata dalla dura e dalle adiacenti radici spinali. La citologia ha evidenziato una popolazione di cellule giganti multinucleate (CGM), caratterizzate da moderato/abbondante citoplasma anofilo contenente granulazioni metacromatiche, su un fondo di materiale amorfo eosinofilo fibrillare e granulare e rari cristalli. Si osservavano anche cellule di aspetto fusato disposte singolarmente o in gruppi tridimensionali lassamente coesi.

L'esame istologico della massa ha evidenziato cellule fusate disposte in piccoli fasci e vortici, e CGM immerse in un'abbondante e regolare matrice extracellulare eosinofila, collagena e reticolare, tendente alla mineralizzazione, disseminata di strutture rotondeggianti PAS e von Kossa positive (corpi pseudopsammomatosi). Materiale PAS+ si apprezzava anche nel citoplasma di numerose CGM. Le indagini immunohistochemiche (IHC) mostravano una diffusa positività alla vimentina, S100, GFAP. Isolate cellule fusate esprimevano NSE. Le CGM esprimevano anche neurofilamenti (NF) e cromogranina A (CgA), isolatamente pancitocheratine. Negativi sinaptofisina e Ki67. Mentre i PNST sono stati esclusi per la totale integrità delle radici in questa sede, il sarcoma sinoviale e il tumore a CG di tendini/legamenti sono stati esclusi per la positività alla CgA, NSE, GFAP e NF; il sarcoma di Ewing è stato escluso per la positività a GFAP e CgA. Sulla base della localizzazione, del pattern istologico e dei risultati IHC il tumore è stato identificato come tumore bifasico a cellule giganti multinucleate simulante un meningioma secretorio a singolare differenziazione neuroendocrina.

Parole chiave: gatto, tumore spinale, meningioma, cellule giganti

AN UNUSUAL GIANT CELL SPINAL CORD TUMOR IN A CAT

We reported a spinal tumor in a six-year-old male shorthair cat. MRI revealed a mass of 0.90x0.80 cm in C4. At surgery the neoplastic tissue was extradural. Adjacent spinal nerve roots and dura mater were not involved. Cytology revealed multinucleated giant cell (MGC) having a moderate/abundant amphiphile cytoplasm with metachromatic granulations, and isolated or organized in loose to three-dimensional aggregated cluster spindle-shaped cells. A fibrillary or granular eosinophilic matrix and occasionally christsals were detected. Histologically, the mass showed spindloid and large MGC in hyaline and reticular stroma with diffuse mineralization granules and bodies PAS+. Mitotic figures were absent. Vimentin, S100, GFAP, were expressed by both the neoplastic cell types, while spindloid cells were NSE+. MGC were also NF- and chromogranin-positive, and occasionally pancytokeratin-positive. Synaptophysin was not expressed. Based on morphological findings and immunophenotype, synovial and Ewing sarcoma, and tendon sheath GC tumor were excluded. The completely absence of spinal root involvement allowed us to exclude PNST. Histological and IHC patterns are consistent with a biphasic MGC tumor mimicking secretory meningioma with an unusual neuroendocrine differentiation.

Key words: cat, spinal tumor, meningioma, giant cells

TRATTAMENTO CON ELETTROCHEMIOTERAPIA DI ALCUNI TUMORI ORALI DEL CANE E DEL GATTO

Puleio Roberto¹, Cassata Giovanni¹, Schiavo Maria Rita¹, Tamburello Anna¹, Poli Alessandro², Ressel Lorenzo², Loria Guido Ruggero¹

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia¹, Dipartimento di Patologia Animale Profilassi ed Igiene degli Alimenti -Università di Pisa²

L'Elettrochemioterapia (ECT) può essere definita come l'applicazione topica di impulsi elettrici che ottimizzano la permeabilità delle cellule tumorali ai trattamenti chemioterapici. I farmaci solitamente utilizzati sono la Bleomicina e il Cisplatino. Nel nostro studio sono stati selezionati tre casi di neoplasie del cavo orale (due melanomi ed un carcinoma squamo cellulare) in cui il trattamento chirurgico o chemioterapico era stato rifiutato dal proprietario. I soggetti venivano preventivamente anestetizzati, quindi la neoplasia veniva infiltrata sia lungo i margini che per via intratumorale con Bleomicina o Cisplatino. Dopo cinque minuti veniva applicata l'elettroporazione attraverso l'uso di un elettrodo (*Cliniporator*®, Igea) che veniva inserito nella massa neoplastica, per trasmettere gli impulsi elettrici (scariche di 8 impulsi della durata di 100 microsecondi, 1000 volt di ampiezza e frequenza 5 kHz). La ECT è stata ripetuta dopo 14 e 30 giorni. I soggetti trattati con l'ECT non hanno sviluppato effetti tossici dovuti al chemioterapico ed non hanno evidenziato problemi durante l'anestesia. Già al primo trattamento, tutti i soggetti hanno evidenziato una diminuzione di volume delle masse tumorali, che si rendeva evidente con un miglioramento del benessere degli animali (migliore prensione e masticazione del cibo ed assenza di sanguinamento). La risposta è stata, nel caso 1 e 3, rappresentata da una riduzione del volume neoplastico del 60%, fino alla sua scomparsa dopo il terzo trattamento. Nell'altro caso abbiamo ottenuto una regressione del tumore, dopo il primo trattamento del 30% e del 60% dopo il secondo. L'ECT è risultata una tecnica innovativa ed efficace che ha dimostrato una bassa tossicità e grande maneggevolezza, che ne permette l'uso ripetuto nel tempo o anche l'associazione con la chirurgia. Le biopsie seriali ottenute per ciascun caso clinico, evidenziavano marcata necrosi circoscritta al tessuto tumorale e risposta infiammatoria mediata da linfociti e plasmacellule. In conclusione l'ECT permette il trattamento delle neoplasie orali del cane e del gatto con obiettivi miglioramenti della qualità di vita del paziente a fronte di rischi anestesiológicos e tossicologici ridotti.

Parole chiave: elettrochemioterapia, tumori orali, bleomicina, cisplatino

ELECTROCHEMOTHERAPY (ECT) IN CANINE AND FELINE ORAL CANCERS

Electrochemotherapy (ECT) is an innovative anticancer therapy presently standardized for treatment of skin and subcutaneous tumors. ECT is based on the use of non-permeant drugs possessing high intrinsic cytotoxicity (such as Bleomycin), or low-permeant drugs with known efficacy (such as Cisplatin). ECT associates the administration of anti-tumor agent to local application of short and intense electric pulses that transiently permeabilize neoplastic cells. The increased uptake of chemotherapy leads to death of the proliferating cells, thus resulting in a potential local control and an increased survival time. We report three cases of oral cancer treated with ECT. Two dogs and one cat with different tumors (two melanomas and one squamocellular carcinoma) treated with three sessions of ECT under general anesthesia. All pets were treated with local injection of chemotherapeutic drug (Bleomycin and Cisplatin) followed by trains of eight electric pulses. All patients responded to the treatment, with evident reduction of tumor size four weeks after treatment in two cases, while other one partially responded. This study showed that ECT could be an effective, safe and simple local treatment of different histological types of oral tumors in cats and dog.

Key words: electrochemotherapy, oral tumors, bleomycin, cisplatin

ESPRESSIONE DI LIPOPOLYSACCHARIDE BINDING PROTEIN IN TESSUTI BOVINI NON PATOLOGICI

Rahman Mizan Md^a, Lecchi Cristina^a, Sartorelli Paola^{ab}, Avallone Giancarlo^a, Roccabianca Paola^{ab}, Ceciliani Fabrizio^{ab}

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

La Lipopolysaccharide binding Protein (LBP) è una proteina di fase acuta coinvolta nella risposta immunitaria aspecifica contro le endotossine batteriche. La LBP è sintetizzata dagli epatociti e rilasciata come una glicoproteina di 60 kDa. Lo scopo del lavoro è stato di valutare la presenza di LBP in tessuti normali di bovino tramite *polymerase chain reaction* (PCR) qualitativa e quantitativa, ed immunostochimica utilizzando un anticorpo anti-LBP umana cross reattivo con i tessuti bovini. La cross reattività è stata dimostrata tramite la distribuzione dell'espressione e *Western blotting*. La PCR *real time* ha rivelato una elevata quantità di mRNA nei prestomaci, nella ghiandola sottomandibolare, nella parotide, nella mammella e nel miocardio. Una moderata quantità di mRNA era presente in muscoli scheletrici, surrene ed intestino cieco. Minore quantità di mRNA era presente in colon, timo, testicoli, cervelletto, polmoni e fegato. L'espressione di LBP è stata identificata nell'endotelio vascolare, nei dotti di vari organi e nei prestomaci. L'espressione di mRNA e della proteina non erano sempre correlati. Le discrepanze osservate potrebbero dipendere da un rapido turnover secretorio di LBP che hanno impedito l'identificazione immunostochimica. In particolare, LBP era consistentemente espressa nei prestomaci e l'mRNA era elevato nell'intestino, tutti epiteli a contatto costante con le endotossine batteriche. In questi tessuti la trascrizione e la traduzione di LBP potrebbero indicare un ruolo protettivo della proteina contro le endotossine al fine di mantenere l'integrità della barriera mucosale. Il riscontro di LBP negli endoteli e nei dotti potrebbe indicare un ruolo protettivo di LBP durante l'assorbimento e l'escrezione delle endotossine batteriche stesse.

Parole chiave: LBP, proteine di fase acuta. bovino, espressione, endotossine

INTRODUCTION

Lipopolysaccharide (LPS) is a highly proinflammatory molecule that is shed from the bacterial surface during bacterial replication or death (Raetz, 1990) and plays an important role in the pathogenesis of various infections caused by gram-negative bacteria (Heumann et al., 2001). It can stimulate a variety of host cells to express proinflammatory molecules (Ulevitch and Tobias, 1995). Its effects are strongly enhanced by LPS-binding protein (LBP) (Tapping and Tobias, 1997), an acute phase protein mainly synthesized by hepatocytes and released after glycosylation, which is especially involved in the recognition of pathogenic bacteria (Schumann et al., 1990). Its serum concentrations is 5 to 15 mg/mL. During the acute phase response, IL-1 and IL-6 induce LBP synthesis, with an increase of LBP serum concentrations (Schumann et al., 1996; Opal et al., 1999). It is believed to facilitate LPS presentation to CD14 of macrophages and PMN (Hailman et al., 1994; Weiss, 2003) which, with MD-2, function as receptors for LPS, leading to activation of TLR4 and to inflammatory response (Zweigner et al., 2006). LBP transfers LPS to soluble CD14, resulting in activation of membrane CD14-negative cells such as endothelial and epithelial cells (Pugin et al., 1993). LBP also accelerates the transport of LPS into high-density lipoprotein, leading to neutralization of LPS (Wurfel et al., 1994) which may be protective during severe sepsis (Jack et al., 1997; Lamping et al., 1998).

It has recently been discovered that epithelial cells of the intestines and the lungs *in vitro*, human gingival tissues, small muscle cells of the lung, heart muscle cells and renal cells may represent additional sources of LBP (Vreugdenhil et al., 1999). Production of LBP within the central nervous system was suggested in experimental meningitis (Weber et al., 2003). However, there is not ample information on LBP distribution in varieties of tissues. Investigations regarding LBP distribution in bovine tissues have been completely lacking. So our interest was to locate this protein in wide panel of bovine tissues as local source.

MATERIALS AND METHODS

Tissue Collection and Preservation

Series of bovine tissues were collected from local slaughter house from clinically healthy animals.

Sections from liver were used as positive control for LBP expression studies in other tissues. RNA was extracted from the tissues preserved in RNA-Later (Sigma-Aldrich) and stored in -80 °C; sections for immunohistochemistry were taken from tissues preserved in liquid nitrogen just after collection and stored in -80 °C.

mRNA expression

Total RNA was extracted from bovine tissues using the TRIzol Reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol and genomic DNA was eliminated using Deoxyribonuclease I (Invitrogen). The reverse transcription (RT) reaction was carried out on 1 µg RNA using iSCRIPT cDNA SYNTHESIS Kit (Bio-Rad). Quantitative reactions were described in table 1. The results obtained were compared using the delta-delta Ct method (Giulietti et al., 2001).

Immunohistochemistry

Cross reactivity of monoclonal antihuman LBP antibody in bovine tissues was validated with Western Blotting. The localization of LBP in different tissues was investigated by immunohistochemistry. Cryo preserved tissues were cut 10 µm thick, mounted on slides, air dried, fixed in acetone (5 min) and stored at -70 °C. Sections were stained using a streptavidin-biotin peroxidase complex method with antihuman LBP monoclonal antibody (1µg/1µl). As negative controls, the specific antibody was substituted either with an isotype-matched or an irrelevant monoclonal antibody, or completely omitted. Frozen sections of bovine liver were used as positive controls and to check for normal distribution of the antigen.

RESULTS

RT-PCR

Major LBP mRNA expression was observed in forestomachs, heart, sub-mandibular, parotid, and mammary gland. Moderate amount of mRNA was detected in skeletal muscles, adrenal gland and cecum. mRNA was also found in testes, colon, thymus, cerebellum, lung and liver ([Fig. 1](#))

Immunohistochemistry

Western Blot results demonstrated anti-human LBP's cross reactivity in bovine compared with human serum. Almost every tissues included in our study express LBP (table 2). Liver has minor expression in comparison other tissues. The

protein is ubiquitously present in endothelium of blood vessels, on all organs and epithelium of ductal systems of glandular structures. Parts of forestomachs consistently express LBP where it was found in epithelium, muscular and connective tissue part. Lymphocytes and macrophages distributed in different organs also express this protein. LBP expression in some tissues has been shown in fig. 2, 3 and 4.

DISCUSSION

This is the very first reports of LBP expression in bovine tissues.

Our results revealed a widespread extrahepatic expression of LBP in bovine tissues.

Both Real Time PCR and IHC results revealed high mRNA amount and protein in forestomachs. The compound stomach and intestinal mucosa form a large surface that is continuously exposed to these microbial products. By secretion of this immuno modulating agent from different parts contributes to build up defense mechanism against bacteria and their products.

Higher expression of mRNA expression was evident in mammary gland, that is frequently threatened to bacteria and their endotoxins especially during mastitis, especially from Gram negative bacteria. The local expression of LBP in epithelial cells might play a role in limiting the penetration of LPS to mammary gland tissues by binding LPS, probably through the exfoliation of LPS-LBP complex. Increased levels of LBP in bovine blood and milk were reported following challenge of LPS (Bannerman et al. 2003) or in naturally acquired clinical mastitis in cows (Zeng et al, 2008). Our findings support the hypothesis that LBP can be synthesized in mammary epithelium and can be released locally.

To the authors` knowledge there is no information regarding expression of LBP in salivary glands. An unsuccessful attempt was taken by Uehara et al. (2003) to detect LBP and CD14 levels in normal saliva. Major expression of LBP mRNA was found in both parotid and submandibular salivary glands. On IHC in submandibular salivary gland LBP was detected in ductal epithelium and endothelial cells of vessels. Saliva contains a number of proteins and glycoproteins that protect oral tissues (Humphrey and Williamson, 2001). May be the LBP produced in salivary gland and is carried into the oral cavity to maintain oral health.

We found glial cells in brain and cerebellum positive for LBP expression. Endothelial cells in

brain also expressed LBP. LBP concentration was found to be increased in CSF of patients with neurological disorders (Heuman et al., 1995) and of mouse with pneumococcal meningitis (Weber et al., 2003), though LBP is historically dedicated to gram negative infections. Taken together this information with our findings we can speculate that LBP can be released locally in brain and cerebellum in both gram positive and gram negative bacterial infections to uphold local immunity.

CONCLUSIONS

The expression of LBP by different tissues explicate that LBP can be produced locally and potentially leads to a highly specific response at the site of exposure to bacteria. There are evidences that LBP has protective role in local infections (Lamping et al., 1998; Jack et al., 1997). Though the intensity of protein expression did not parallel mRNA expression. The discrepancy might depend on a rapid secretory turnover of LBP that didn't allow its identification by the antibody, or by microRNA silencing of LBP mRNA.

REFERENCES

1. Bannerman DD, Paape MJ, Hare WR, Sohn EJ. *J Dairy Sci.* 2003;86:3128–3137.
2. Hailman E, Lichenstein HS, Wurfel MM, Miller DS, Johnson DA, Kelley M, Busse LA, Zukowski MM, Wright SD. *J Exp Med* 1994;179:269–277.
3. Heumann D, Adachi Y, Le Roy D, Ohno N, Yadomae T, Glauser MP, Calandra T. *Infect Immun* 2001;69(1):378–385.
4. Heumann D, Gallay P, Barras C, Albrecht H, de Flaugergues JC, Steck A, Glauser MP. *Journal of Endotoxin Research*, 1995;2(1):1-7.
5. Humphrey SP and Williamson RT.. *J. Prosthet. Dent.* 2001;85:162–169.
6. Jack JS, Fan X, Bernheiden M, Rune G, Ehlers M, Weber A, Kirsch G, Mentel R, Furr B, Freudenberg M, Schmitz G, Stelter, and Schütt C. *Nature* 1997;389:742–745.
7. Lamping NR, DettmerN, Schröder WJ, Pfeil D, Hallatschek W, Burger R and Schumann RR. *J. Clin. Invest.* 1998; 101:2065–2071.
8. Opal SM, Scannon PJ, Vincent JL, White M, Carroll SF, Palardy JE, Parejo NA, Pribble JP, Lemke JH. *J Infect Dis.* 1999;180:1584-1589.

9. Pugin J, Schurer-Maly CC, Leturcq D, Moriarty A, Ulevitch RJ, Tobias PS. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* 1993;90:2744.
10. Raetz CR. *Annu Rev Biochem* 1990;59:129–170.
11. Schröder NWJ, Schumann RR. *Journal of Endotoxin Research*, 2005; 11(4):237-242.
12. Schumann RR, Kirschning CJ, Unbehauen A, Aberle HP, Knope HP, Lamping N, Ulevitch RJ, Herrmann F. *Mol Cell Biol.* 1996;16:3490-3503.
13. Schumann RR, Leong SR, Flaggs GW, Gray PW, Wright SD, Mathison JC, Tobias PS, Ulevitch RJ. *Science* 1990;249:1429–1431.
14. Tapping RI, Tobias PS. *J Biol Chem* 1997;272:23157–164.
15. Uehara A, Sugawara S, Watanabe K, Echigo S, Sato M, Yamaguchi T, Takada H. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003; 10(2):286-92
16. Ulevitch RJ, Tobias PS. *Annu Rev Immunol* 1995;13:437–457.
17. Vreugdenhil ACE, Dentener MA, Snoek AMP, Greve JWM, Buurman WA. *J Immunol.* 1999; 163:2792- 2798.
18. Weber JR, Freyer D, Alexander C, Schroder NW, Reiss A, Kuster C, Pfeil D, Tuomanen EI, Schuman RR. *Immunity* 2003;19:269-279.
19. Weiss J. *Biochemical Society Transactions.* 2003; 31, part 4.
20. Wurfel MM, Kunitake ST, Lichenstein H, Kane JP, Wright SD. *J Exp Med.* 1994;180:1025-1035.
21. Zeng R, Bequette BJ, Vinyard BT, Bannerman DD. 2008. *J Dairy Sci.* 2009;92(3):980-9.
22. Zweigner J, Schumann RR, Weber JR., 2006. *Microbes Infect* 8:946–952.

22.

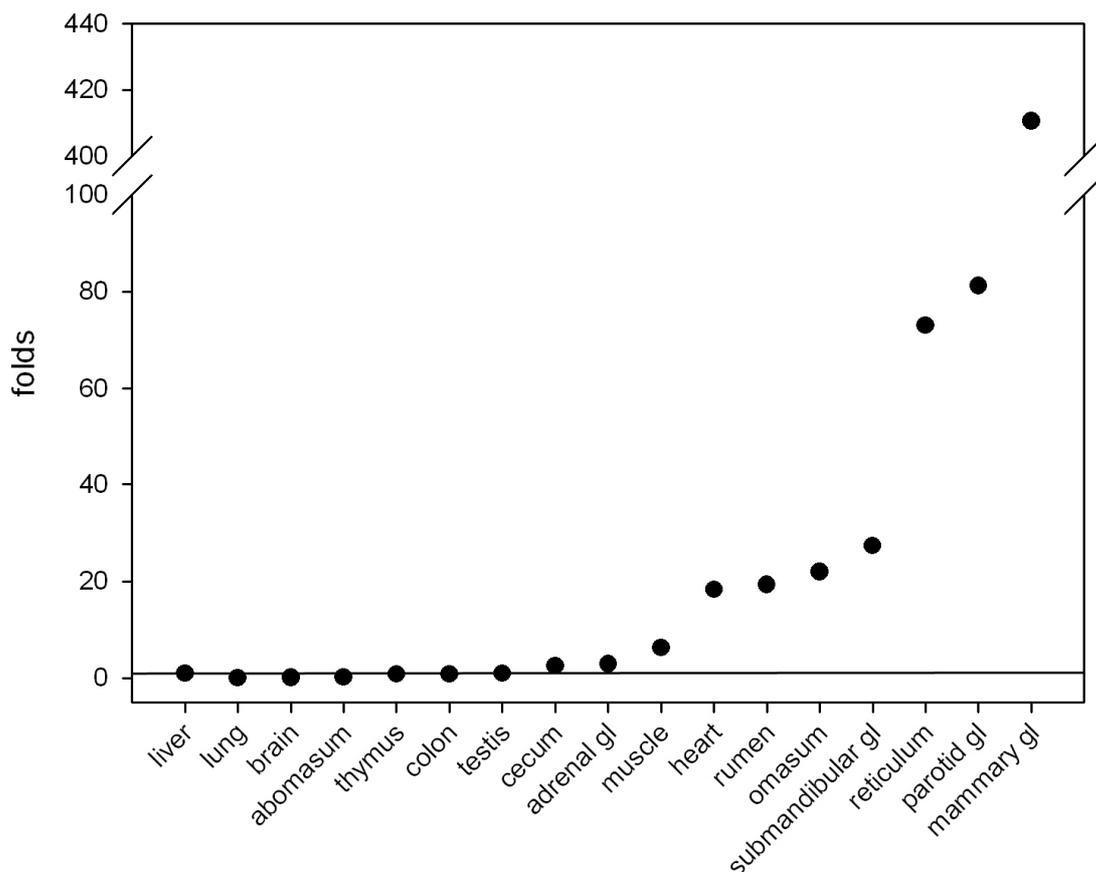


Figure -1: LBP mRNA expression in normal bovine tissues.

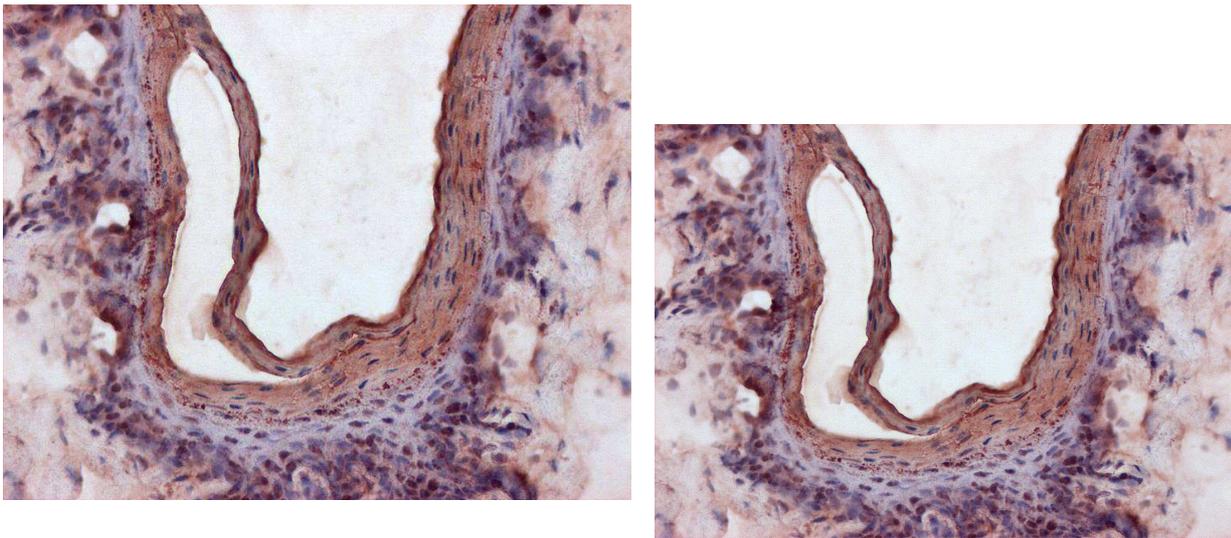


Figure 2: Omasum. Diffuse cytoplasmic expression of LBP in superficial layers of the epithelium. Immunoperoxidase stain, AEC chromogen, 10x magnification.

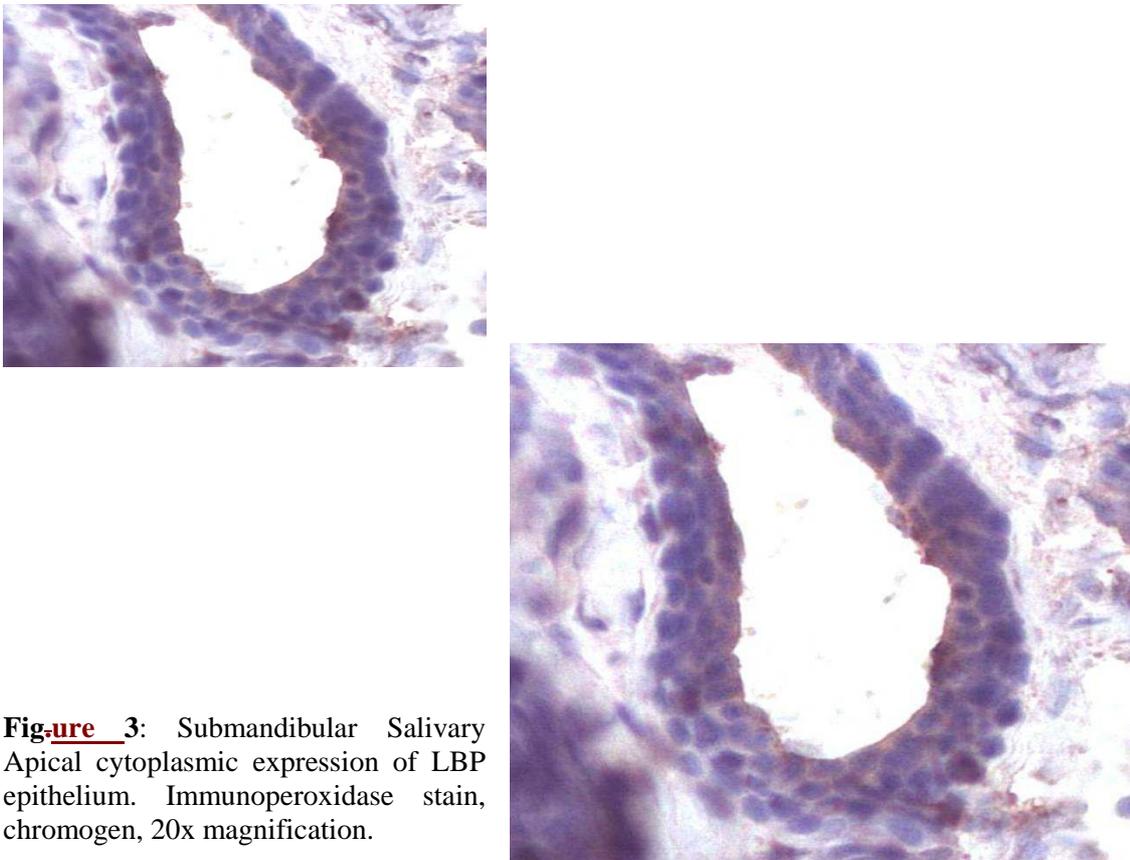


Figure 3: Submandibular Salivary Gland. Apical cytoplasmic expression of LBP in ductal epithelium. Immunoperoxidase stain, AEC chromogen, 20x magnification.

Gland.
in ductal
AEC

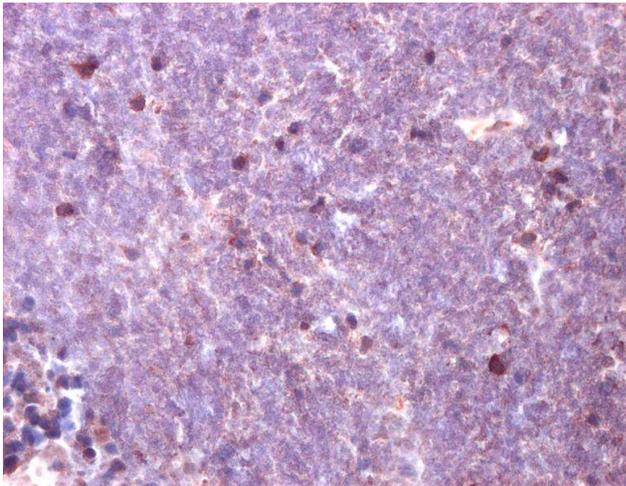
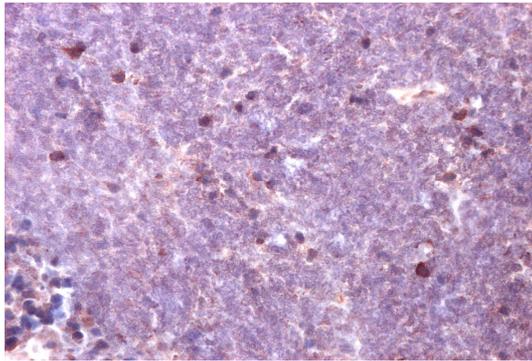


Figure 4: Cerebellum, white matter. Intense cytoplasmic expression of LBP in the cytoplasm of microglial cells. Immunoperoxidase stain, AEC chromogen, 20x magnification.

	Primers	Thermal profile applied	
LBP sense LBP antisense <input type="checkbox"/> actin sense <input type="checkbox"/> actin antisense	CCTGATTCTAGCATTTCG	1st denaturation	90sec 95°C
	ACAG	2nd denaturation	15sec 95°C
	GCTGAAGTTCAGGCACG	Annealing- extension	60sec 60°C
	CCAAAGCCAACCGTGA	(50 cycles)	
	GA		
	CCAGAGTCCATGACAAT	melting curve	starting to 55°C
	GC	(80 cycles)	and increasing 0.5°C each 10sec

Primers		Thermal profile	
LBP sense	CCTGATTCTAGCATTTCGACAG	1st denaturation	90sec 95°C
LBP antisense	GCTGAAGTTCAGGCACG	2nd denaturation	15sec 95°C
β actin sense	CCAAAGCCAACCGTGA	Annealing- extention 50 cycles	60sec 60°C
β actin antisense	CCAGAGTCCATGACAATGC	Melting curve 80 cycles	starting 55°C increasing 0.5°C each 10sec

Table 1: Primers and thermal profile description used in Real Time PCR. Quantitative reactions performed in 25 µl of SYBR Green mix (Bio-Rad) and 400 nM of each primers. Each sample was tested in duplicate. In order to evaluate the PCR efficiency, series of dilution were prepared by performing fourfold serial dilution starting from the reference samples. The thermal profile was the same for each target gene.

Tissue	Results / Interpretation of IHC	RT PCR folds relative to liver=1
Small Intestine	Muscular wall ++, diffuse Lymphatic endothelial cells +++ Epithelium -ve Muscular wall of blood vessels +++	ND
Mammary Gland	Epithelial cells ++multifocal Endothelial cells ++	410.5645
Liver	Diffuse +	1
Submandib. Gl.	Endothelial cells + Apical portions of epithelial cells +	27.27735
Rumen	Muscular wall diffuse ++ Epithelium ++, Blood vessels ++ Capillary endothelium +++	19.30276
Reticulum	Muscular wall diffuse ++ Epithelium + Endothelial cells +++	72.99405
Omasum	Muscular wall ++ Epithelium ++ Diffuse + for superficial basal layers (??) -ve for supra basal layers	21.93321
Abomasum	Apical portions of the glandular cells +++ Endothelial cells of small vessels +++ Vascular wall +	0.153049
Cecum	Muscular wall diffuse ++	2.549971
Colon	Muscular wall ++ Endothelial cells +++ Epithelium ?	0.8007
Brain	Glial cells +++ Endothelial cells +++	0.087015
Cerebellum	Glial cells of white matters +	
Lung	Lymphocytes + MQ + Endothelial cells ± Respiratory type II epithelial cells +	NR

Table 2: Local expression of LBP in normal bovine tissue.

EXPRESSION OF LIPOPOLYSACCHARIDE BINDING PROTEIN IN NON PATHOLOGIC BOVINE TISSUES

Lipopolysaccharide binding Protein (LBP) is an acute phase protein involved in host's response to endotoxins, synthesized by hepatocytes and released as 60 kDa glycoprotein. The aim of this study was to evaluate the expression of LBP in diverse bovine tissues by qualitative and quantitative PCR and immunohistochemistry (IHC). IHC was performed with an anti-human LBP antibody and cross reactivity was confirmed by tissue distribution and Western blotting. Real time PCR revealed high LBP mRNA amount in forestomachs, heart, sub-mandibular, parotid, and mammary gland. Moderate amount of mRNA



was detected in skeletal muscles, adrenal gland and cecum. mRNA was also found in testes, colon, thymus, cerebellum, lung and liver. LBP protein expression was observed in vascular endothelium, in ductal structures of several organs and in the epithelium of the forestomachs. Intensity of protein expression did not paralleled mRNA expression. The discrepancy might depend on a rapid secretory turnover of LBP that didn't allow its identification by the antibody, or by microRNA silencing of LBP mRNA. LBP was expressed in forestomachs and mRNA was elevated in the intestine, all these are epithelial structures constantly challenged by endotoxins. LBP may be released to protect the host from endotoxins and to maintain the integrity of the mucosal barrier. Endothelial and ductal LBP expression may be indicative of the protective role of LBP during bacterial endotoxin adsorption and excretion.

Key words: LBP, acute phase protein, bovine, expression, endotoxin

CORRELAZIONE TRA LESIONI ANATOMO-ISTOPATOLOGICHE E QUADRO CLINICO IN CANI NATURALMENTE INFETTI DA *LEISHMANIA INFANTUM*

Restucci B., Oliva G., Foglia Manzillo V., Maiolino P.

*Dipartimento di Patologia e Sanità animale – Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie
Facoltà di Medicina Veterinaria Napoli*

Introduzione: La leishmaniosi viscerale zoonotica (ZVL) sostenuta da *Leishmania infantum* è una grave patologia dell'uomo, endemica in Italia, di cui il cane rappresenta il principale serbatoio d'infezione. Nel cane la malattia è caratterizzata da un'ampia variabilità di segni clinici, accompagnati da modificazioni ematologiche ed ematobiochimiche: linfadenopatia, perdita di peso, lesioni cutanee ed oculari, aumento delle proteine sieriche, inversione del rapporto albumine/globuline, proteinuria, anemia non rigenerativa, aumento dei parametri di funzionalità renale.

Scopo del lavoro è valutare le lesioni anatomo-istopatologiche in naturalmente cani infetti da *Leishmania infantum*, non sottoposti a trattamento terapeutico, e correlarli ai sintomi clinici e alle modificazioni ematobiochimiche presentati dagli animali, in modo da ottenere un quadro completo di tutti i danni che il parassita può arrecare all'organismo nel corso della malattia.

Materiali e metodi: Sono stati presi in considerazione 10 cani, viventi in aree altamente endemiche del Sud Italia e monitorati clinicamente per un periodo di circa due anni. L'infezione da *Leishmania infantum* è stata confermata mediante IFAT (cut off. 1:80), Nested (n)-PCR da ago aspirato midollare e coltura per *Leishmania infantum* da ago aspirato linfonodale. Nell'arco dei due anni i soggetti sono stati sottoposti a visita clinica e ad esami ematologici, ematobiochimici ed urinari routinari, con cadenza di 3-6 mesi. I soggetti sono stati sottoposti ad eutanasia, per volere dei proprietari, a causa dello stato palese di malattia. In tutti i soggetti è stato prontamente eseguito l'esame necroscopico e il prelievo di organi per l'esame istologico.

Risultati: Tutti i cani compresi nello studio mostravano un'infezione patente sintomatica. I segni clinici più frequentemente osservati erano rappresentati da letargia, dimagrimento progressivo, aumento di volume dei linfonodi esplorabili, splenomegalia e da alterazioni dell'emocromocritico, delle proteine sieriche e da aumento del rapporto Pu/Cu. In sede di necropsia, le lesioni anatomopatologiche costantemente osservate erano rappresentate da aumento di volume dei linfonodi esplorabili che presentavano una colorazione rosso scura a carico della midollare; splenomegalia a volte imponente, con spostamento della milza al centro della cavità addominale, e segni di splenite iperplastica; quadri di glomerulonefrite a volte associati a ispessimenti degli interstizi; aumento di volume del fegato con quadri distrofici e presenza di piccoli punti e strie grigiastre disseminati in superficie ed in sezione di taglio.

Gli esami istopatologici evidenziavano quadri iperplastici a carico dei linfonodi e della milza con presenza di macrofagi carichi di emosiderina; glomerulonefrite prevalentemente membranosa, ialinosi dei glomeruli e lesioni degenerative a carico degli epitelii tubulari; epatiti croniche lobulari con infiltrati linfo-plasmacellulari prevalentemente negli spazi portobiliari.

Conclusioni: Gli esami anatomopatologici eseguiti in sede di necropsia hanno confermato che il rene è il principale organo bersaglio in corso di infezione cronica da *Leishmania infantum*; interessante, a nostro avviso, risulta anche il costante coinvolgimento epatico. Contrariamente agli altri segni clinici osservati, tale reperto anatomopatologico, non trova riscontro specifico nei segni clinici e nei parametri di laboratorio monitorati nel tempo. Il riscontro costante di lesioni epatiche all'esame necroscopico di cani infetti da *Leishmania infantum*, anche in soggetti di giovane età e con decorsi clinici non eccessivamente lunghi (circa 1 anno dalla prima diagnosi d'infezione), deve essere tenuto in debita considerazione, allo scopo di identificare segni clinici precoci di danno epatico e, soprattutto, riconsiderare con maggiore attenzione la necessità di un monitoraggio più adeguato della funzionalità epatica.

Parole chiave: leishmaniosi, segni clinici, lesioni anatomopatologiche

INTRODUZIONE

La leishmaniosi viscerale zoonotica (ZVL) sostenuta da *Leishmania infantum* è una grave patologia dell'uomo, endemica in Italia, di cui il cane rappresenta il principale serbatoio d'infezione. Nel cane la malattia è caratterizzata da un'ampia variabilità di segni clinici, accompagnati da modificazioni ematologiche ed ematobiochimiche: linfadenopatia, perdita di peso, lesioni cutanee ed oculari, aumento delle proteine sieriche, inversione del rapporto albumine/globuline, proteinuria, anemia non rigenerativa, aumento dei parametri di funzionalità renale.

Scopo del lavoro è valutare le lesioni anatomico-istopatologiche in naturalmente cani infetti da *Leishmania infantum*, non sottoposti a trattamento terapeutico, e correlarli ai sintomi clinici e alle modificazioni ematobiochimiche presentati dagli animali, in modo da ottenere un quadro completo di tutti i danni che il parassita può arrecare all'organismo nel corso della malattia.

MATERIALI E METODI

Sono stati presi in considerazione 10 cani, viventi in aree altamente endemiche del Sud Italia e monitorati clinicamente per un periodo di circa due anni. L'infezione da *Leishmania infantum* è stata confermata mediante IFAT (cut off. 1:80), Nested (n)-PCR da ago aspirato midollare e coltura per *Leishmania infantum* da ago aspirato linfonodale (tabella 1). Nell'arco dei due anni i soggetti sono stati sottoposti a visita clinica e ad esami ematologici, ematobiochimici ed urinari routinari, con cadenza di 3-6 mesi. I soggetti sono stati sottoposti ad eutanasia, per volere dei proprietari, a causa dello stato palese di malattia. In tutti i soggetti è stato prontamente eseguito l'esame necroscopico e il prelievo di organi per l'esame istologico.

RISULTATI

Tutti i cani compresi nello studio mostravano un'infezione patente sintomatica. I segni clinici più frequentemente osservati erano rappresentati da letargia, dimagrimento progressivo, aumento

di volume dei linfonodi esplorabili, splenomegalia e da alterazioni dell'emocromocitometrico, delle proteine sieriche e da aumento del rapporto Pu/Cu. In sede di necroscopia, le lesioni anatomopatologiche costantemente osservate erano rappresentate da aumento di volume dei linfonodi esplorabili che presentavano una colorazione rosso scura a carico della midollare; splenomegalia a volte imponente, con spostamento della milza al centro della cavità addominale (Fig. 1), e segni di splenite iperplastica; quadri di glomerulonefrite a volte associati a ispessimenti degli interstizi; aumento di volume del fegato con quadri distrofici e presenza di piccoli punti e strie grigiastre disseminati in superficie ed in sezione di taglio.

Gli esami istopatologici evidenziavano quadri iperplastici a carico dei linfonodi e della milza con presenza di macrofagi carichi di emosiderina, glomerulonefrite prevalentemente membranosa, ialinosi dei glomeruli e lesioni degenerative a carico degli epitelii tubulari (Fig. 2), epatiti croniche lobulari con infiltrati linfoplasmacellulari prevalentemente negli spazi portobiliari (Fig. 3).

CONCLUSIONI

Gli esami anatomopatologici eseguiti in sede di necroscopia hanno confermato che il rene è il principale organo bersaglio in corso di infezione cronica da *Leishmania infantum*; interessante, a nostro avviso, risulta anche il costante coinvolgimento epatico. Contrariamente agli altri segni clinici osservati, tale reperto anatomico-istopatologico, non trova riscontro specifico nei segni clinici e nei parametri di laboratorio monitorati nel tempo. Il riscontro costante di lesioni epatiche all'esame necroscopico di cani infetti da *Leishmania infantum*, anche in soggetti di giovane età e con decorsi clinici non eccessivamente lunghi (circa 1 anno dalla prima diagnosi d'infezione), deve essere tenuto in debita considerazione, allo scopo di identificare segni clinici precoci di danno epatico e, soprattutto, riconsiderare con maggiore attenzione la necessità di un monitoraggio più adeguato della funzionalità epatica.



Figura 1. Cane: imponente splenomegalia che comporta uno spostamento della milza stessa al centro della cavità addominale

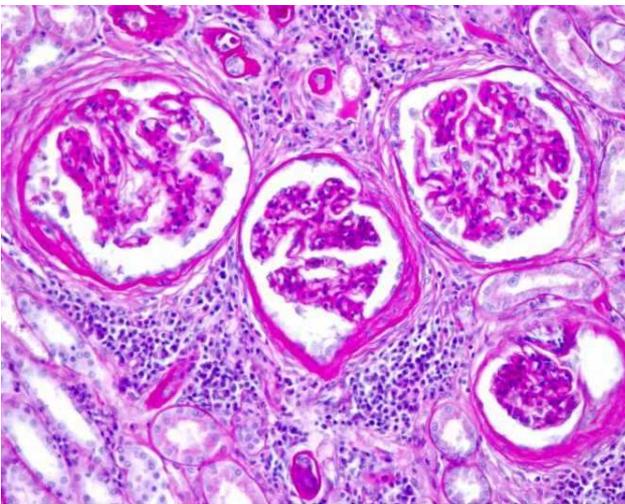


Figura 2. Rene: glomerulonefrite sierofibrinosa caratterizzata da materiale denso, omogeneo, PAS+, nello spazio di Bowmann. Nefrite interstiziale con infiltrati linfoplasmocitari. Metodica PAS, 20X.

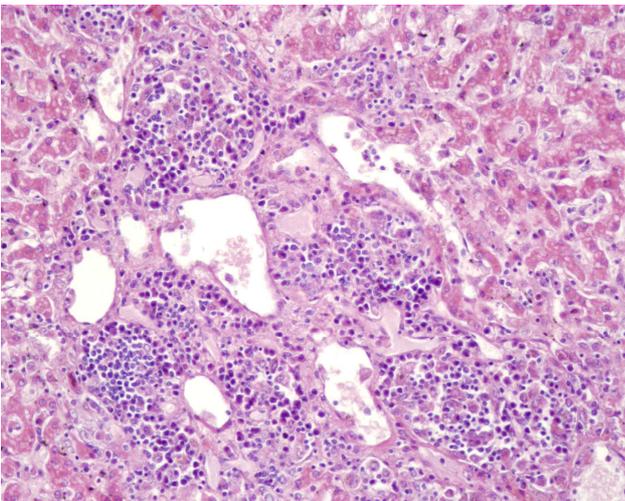


Figura 3. Fegato: focolai di epatite interstiziale con infiltrati linfoplasmocitari. Ematossilina-eosina 20X.

Razza	Età	IFAT 1	IFAT 2	n-PCR 1	n-PCR 2
Beagle	3 anni	1/640	1/40960	+	+
Beagle	3 anni	< 1/40	1/20480	+	+
Beagle	3 anni	<1/40	1/2560	+	+
Beagle	3 anni	< 1/40	1/5120	+	+
Beagle	3 anni	<1/40	1/640	+	+
Beagle	3 anni	<1/40	1/2560	+	+
Dobermann	3 anni	<1/40	1/640	+	+
Meticcio	3 anni	1/80	1/640	+	+
Meticcio	3 anni	<1/40	1/1280	+	+
Meticcio	3 anni	1/160	1/2560	+	+

1- valori al momento dell'infezione

2- valori al momento della morte

Tabella 1. razza, età, titoli anticorpali valutati con immunofluorescenza indiretta e positività alla nested PCR per *Leishmania infantum* valutata su agoaspirato midollare

CORRELATION BETWEEN ANATOMOPATHOLOGICAL AND HISTOLOGICAL LESIONS AND CLINICAL SIGNS IN *LEISHMANIA INFANTUM* NATURALLY INFECTED DOGS

Introduction: Dog is the main reservoir of the Zoonotic Visceral Leishmaniasis (ZVL) caused by *Leishmania infantum* in human beings. ZVL is endemic in Italy and in the Mediterranean basin. Canine leishmaniasis (CanL) is characterized by chronic evolution of viscerocutaneous signs which occur in less than 50% of infected dogs. Appearance and severity of clinical signs depend upon the dog's immunological response and disease stage. The most frequent clinical signs are lymph nodes enlargement, weight loss, skin and ocular lesions, spleen enlargement. The most frequent haematological, haematobiochemical and urinary alterations are not regenerative anaemia, hyperproteinemia with albumin/globulin ratio modification, urea and creatinine increase and proteinuria. The aim of the present paper is to correlate the clinical and clinicopathological data to those observed by necropsy and histological examination in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*, that did not received any therapeutic treatment.

Material and Methods: Ten dogs showing a *Leishmania infantum* patent symptomatic infection were included into the study. The diagnosis of CanL was confirmed by clinical signs, immunofluorescence antibody test (IFAT; cut off: 1:80), bone marrow aspirate Nested (n)-PCR and lymph node aspirate EMTM culture. After death necropsy was performed and samples of all organs were fixed in 10% neutral buffered formalin for histological examination.

Results: In all the subjects the main anatomopathological lesions were represented by enlargement of lymph nodes and spleen, which was displaced at the center of the abdominal cavity and showed follicular hyperplasia; glomerulonephritis and sometimes interstitial nephritis, focal chronic hepatitis. Histologically, lymph nodes and spleen showed features of reactive hyperplasia with plasma cells proliferation in the paracortical sinuses and macrophages laden with hemosiderin. In some macrophages amastigotes of *Leishmania* were present. In kidneys, glomeruli exhibited membranous glomerulonephritis with thickening of basement membrane and hyalinization. Some glomeruli were atrophic. Cells of tubuli showed hyaline droplet degeneration. In the liver, chronic hepatitis characterized by little disseminated areas of lymphocytes and plasma cells infiltrates with Kupffer cells containing amastigotes of *Leishmania* were observed.

Conclusions: Anatomical and histopathological examination confirmed the kidney as main target in *Leishmania infantum* infection but our study pointed out also the liver as key organ involved in the pathological process, suggesting a more detailed evaluation of the hepatic function during the clinical examination.

Key words: leishmaniasis, clinical signs, anatomopathological lesions

GANGLIONEURITE MIENTERICA IN CORSO DI ENTEROPATIA ENZOOTICA DEL CONIGLIO: OSSERVAZIONI ISTOLOGICHE ED IMMUNISTOCHEMICHE

Rondena Marco, Ferrazzi Viviana, Grieco Valeria, Binanti Diana, Riccaboni Pietro, Gallazzi Daniele, Grilli Guido

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

Introduzione: L'enteropatia enzootica del coniglio (REE), spesso associata a proliferazione di *Clostridium* spp e/o *Escherichia coli* (EC) è fatale nel coniglio e si presenta clinicamente con dilatazione addominale, distonia e paralisi ciecale (PC) Come per altre distonie intestinali, un ruolo importante nella insorgenza e progressione sembra essere sostenuto da alterazioni dei plessi murali enterici e celiaco. Scopo di questa comunicazione è quello di valutare le lesioni istologiche ed immunoistochimiche di tale innervazione in conigli convenzionali di allevamento in corso di patologia spontanea. Materiali e metodi: 15 soggetti con patologia spontanea sono stati sottoposti a necropsia, durante la quale sono stati effettuati esami batteriologici e prelevati campioni di vari tratti intestinali, nonché il plesso celiaco da utilizzare per esame istologico ed immunoistochimico mediante utilizzo di anticorpi anti – Sinaptofisina (Syn), HSP 27, c-Kit e CD79. Risultati: Accanto al costante isolamento di EC, istologicamente si rilevava enterocolite da linfoplasmacellulare desquamativa a prettamente eterofila. A carico dei plessi mienterici si evidenziava una diffusa cromatolisi centrale neuronale associata a ridotta espressione di Syn, con ganglioneurite linfocitaria da lieve a moderata (dimostrata da sparse positività a CD79), satellitosi e neuronofagia. Il ganglio celiaco, presentava altresì neuroni con cromatolisi centrale e attivazione delle cellule di sostegno. L'espressione citoplasmatica di HSP 27 era notevole sia nell'epitelio mucosale cieco – colico sia alla periferia dei pirenofori dei plessi mienterici e del ganglio celiaco. Discussione: I dati ottenuti, sebbene preliminari, mostrano come siano notevoli le alterazioni del sistema nervoso autonomo in corso di REE nel coniglio. Ulteriori approfondimenti sono necessari per comprendere i meccanismi di perturbazione degli equilibri metabolici cellulari da parte LPS e delle altre tossine batteriche, con conseguente riflesso sulla motilità di tutto il tratto gastroenterico.

Parole chiave: coniglio, enterotiflite, paralisi ciecale, ganglioneurite

MYENTERIC GANGLIONITIS DURING RABBIT ENZOOTIC ENTEROPATHY OF: HISTOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL EVALUATION

Introduction: Rabbit Enzootic Enteropathy (REE) is a fatal condition in rabbit characterized by clinical evidences of cecal paralysis (CP) and intestinal dystonia. Recent studies carried out in human medicine indicated intestinal and celiac ganglionitis as important factor involved in intestinal dystonia. In this respect, aim of this communication is to evaluate ganglionic lesions in rabbit during spontaneous REE. M&M: 15 rabbit were submitted to necropsy, during which intestinal samples for bacteriology, histology and immunohistochemistry (using antibodies against Synaptophysin (Syn), HSP 27, c – Kit and CD79, were taken. Results: Constant findings were bacteriological EC isolation and histological evidence of enterotiflitis from lymphocytic to heterophilic. Enteric and celiac ganglia were characterized by moderate lymphocytic (CD79 +) ganglionitis, severe diffuse central chromatolysis, reduced Syn expression. HSP 27 cytoplasmic staining was intense in enteric epithelium as there as in neurons. Discussion: Our preliminary findings are consistent with severe ganglionic lesions in course of REE in rabbit. Further investigations are required to understand key role of bacteria derived toxins in inducing cell metabolic alterations and, finally, intestinal dystonia.

Key words: rabbit, enterotiflitis, cecal paresis, ganglionitis

RISULTATI PRELIMINARI SU ATTIVITA' SIALILTRANSFERASICA ED ACIDO SIALICO IN SIERO E TESSUTI DI CANI SANI E CON NEOPLASIE MAMMARIE

Rossi Gabriele¹, Meregalli Alice¹, Rondena Marco¹, Moretti Pierangelo², Pecile Alessandro², Paltrinieri Saverio¹

¹Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Università degli Studi di Milano; ²Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie, Università degli Studi di Milano

Nell'uomo, la presenza di tumori metastatizzanti è associata a presenza di acido sialico (Sial) in posizione $\alpha 2,6$ su glicoproteine di membrana e nel siero, mentre tumori meno maligni esprimono per lo più Sial- $\alpha 2,3$. Il tipo di Sial dipende a sua volta dalla attività dell'enzima sialiltransferasi (ST). Scopo dello studio è validare un metodo di rilevazione dell'attività della ST in siero e omogeneati di tessuto e trarre informazioni preliminari su tali parametri in cani sani e con tumori mammari. Dopo adsorbimento di proteine asialilate su piastre ELISA, il materiale in esame è stato aggiunto ai pozzetti insieme a donatori di acido sialico (CMP-NeuAc): l'attività ST- $\alpha 2,6$ o ST- $\alpha 2,3$ è stata rilevata quantificando con lectine biotinilate il Sial- $\alpha 2,6$ (lectina SNAI) ed il Sial- $\alpha 2,3$ (lectina MAA) rispettivamente. Le stesse lectine sono state usate per misurare il tipo di Sial nel siero in condizioni basali (senza CMP-NeuAc) e su sezioni di tessuto. Dopo validazione del metodo, l'analisi di 3 campioni di siero di cani sani ha evidenziato una prevalente attività della ST- $\alpha 2,3$, dato che la concentrazione di Sial- $\alpha 2,3$, più scarsa di quella di Sial- $\alpha 2,6$ in condizioni basali, aumenta in presenza di CMP-NeuAc. L'attività di ST- $\alpha 2,3$ diminuisce nei cani patologici (soprattutto in un soggetto con metastasi) suggerendo che l'equilibrio tra attività ST- $\alpha 2,6$ e ST- $\alpha 2,3$ si sposta verso il primo dei due enzimi, in analogia con quanto rilevato nell'uomo. Tale ipotesi è supportata dai risultati ottenuti su omogenati di tessuto, peraltro caratterizzati da alta variabilità anche tra parti diverse dello stesso tumore, e dall'elevato livello di espressione di Sial- $\alpha 2,6$ nei tessuti neoplastici.

Parole chiave: sialiltransferasi, acido sialico, tumori mammari

INTRODUZIONE

L'acido sialico (acido N-acetilneuraminico o NeuAc) è presente su recettori o su proteine di segnale intercellulare. In particolare, l'NeuAc può legarsi al galattosio delle glicoproteine in posizione $\alpha 2,3$ (Sial- $\alpha 2,3$) o $\alpha 2,6$ (Sial- $\alpha 2,6$). Il tipo di sialilazione presente dipende a sua volta dall'attività dell'enzima sialiltrasferasi (ST) $\alpha 2,3$ o $\alpha 2,6$ (ST $\alpha 2,3$ e ST $\alpha 2,6$, rispettivamente).

La presenza dell'una o dell'altra glicofoma di NeuAc condiziona risposte cellulari quali la suscettibilità ad infezioni virali, o, per quanto riguarda i tumori, l'adesività tra cellule adiacenti e quindi la capacità di metastatizzare. Nell'uomo è stato dimostrato che i tumori metastatizzanti sono associati a presenza di Sial- $\alpha 2,6$ ed a maggiore attività di ST $\alpha 2,6$ sulle cellule¹ e nel siero,^{2,4} mentre i tumori benigni esprimono per lo più Sial- $\alpha 2,3$.

Mancano informazioni su tipo di sialilazione e attività sialiltrasferasica in siero e tessuti di cane, anche perché i metodi di valutazione dell'attività ST sono complessi. Recentemente è stato proposto un metodo basato sull'utilizzo di lectine, molecole caratterizzate da forte affinità per l'acido sialico e da specificità per il tipo di sialilazione presente.⁶

Scopo dello studio è validare tale metodo nel cane e trarre informazioni preliminari su tipo di NeuAc ed attività sialiltrasferasica in cani con tumori mammari metastatizzanti e non.

MATERIALI E METODI

Principio del metodo

Il metodo in oggetto utilizza molecole non sialilate adsorbite su piastre ELISA alle quali viene aggiunto il campione con o senza donatore di NeuAc. In particolare, la valutazione in assenza di donatore di NeuAc permette di valutare il tipo di sialilazione basale, mentre la valutazione in presenza di donatore di acido sialico permette di valutare variazioni di sialilazione rispetto al basale, dovute a ST $\alpha 2,3$ o ST $\alpha 2,6$.

La rilevazione del tipo di sialilazione viene ottenuta mediante le lectine biotinilate ottenute da *Maackia amurensis* (MAA) specifica per Sial- $\alpha 2,3$, e da *Sambucus nigra* (SNAI) specifica per Sial- $\alpha 2,6$. Dopo aggiunta del complesso avidina-perossidasi e del substrato cromogeno la piastra viene sottoposta a lettura e rilevazione della densità ottica (D.O.).

Prove preliminari di messa a punto

Prima di utilizzare il metodo sopra descritto sono state effettuate tre prove preliminari di messa a punto, utilizzando un pool di sieri di cane, la prima per valutare se potesse essere usato, come donatore di NeuAc, un campione di ascite felina contenente una quantità nota di NeuAc, misurata in precedenti studi,⁵ la seconda utilizzando il donatore di acido sialico NeuAc citidina 5'-monofosfato (CMPNeuAc) e concentrazioni diverse del campione, la terza, impostata come la precedente ma basata solo sulle due concentrazioni (25% e 50%) che avevano fornito risultati migliori nella seconda prova.

Selezione degli animali

Sono stati selezionati 3 cani senza neoplasie mammarie da cui è stato prelevato sangue e, in un caso, anche tessuto mammario non neoplastico e 4 cani con tumori mammari da cui è stato prelevato un campione di sangue e, in 3 casi, il tessuto neoplastico. Per verificare l'eventuale presenza di patologie sistemiche, su tutti i campioni di sangue è stato eseguito uno screening ematologico, biochimico ed elettroforetico di base.

Preparazione dei campioni di tessuto

Parte dei campioni è stata fissata in formalina, inclusa in paraffina e sezionata al microtomo per ottenere sezioni da osservare al microscopio per classificare le lesioni. Parte dei campioni è stata congelata in azoto liquido e suddivisa in due aliquote: una da sezionare al criostato per effettuare l'immunomarcatura dell'NeuAc presente utilizzando le stesse lectine biotinilate sopra citate, l'altra da omogeneizzare manualmente per rilevare, nel surnatante dell'omogeneato, il tipo di sialilazione presente e l'attività ST col metodo in fase solida descritto in precedenza.

Rilevazione del tipo di sialilazione e dell'attività sialiltrasferasica

Nei diversi pozzetti di piastre ELISA è stata adsorbita asialofetuina (2 mg/ml in 100 μ l di tampone bicarbonato pH 9,6). Dopo incubazione (18h), lavaggi con PBS/NaN₃, blocking con apposito tampone (1% di albumina bovina in PBS con 0,05% di NaN₃) ed ulteriori lavaggi, ai singoli pozzetti sono stati aggiunti 100 μ l di siero o omogeneato di tessuto, diluiti al 25% in tampone cacodilato 50mM, pH 6,5, ed albumina bovina (10 mg/ml). Ogni campione è stato esaminato in doppio, in assenza e in presenza di CMPNeuAc (50 μ M + MnCl₂ 10mM) e preparando pozzetti per

la rilevazione con entrambe le lectine. Dopo incubazione (3h) e lavaggi, sono stati aggiunti 100 μ l di lectina MAA (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) o SNAI (Vector Laboratories) (2 μ g/ml in PBS).

Dopo incubazione (1h) e lavaggio sono stati aggiunti 100 μ l di complesso avidina-perossidasi (ABC kit, Vector Laboratories) e dopo incubazione (1h) e lavaggi, 100 μ l di substrato per perossidasi (R&D System, Minneapolis, MN, USA). Dopo incubazione (20 min) la reazione è stata arrestata aggiungendo 50 μ l di acido solforico 0,2N.

Infine la piastra è stata letta mediante apposito lettore (Labsystems Multiskan MS, Dasit, Cornaredo, Italy) utilizzando la lunghezza d'onda di 450 nm e 540 nm come lunghezza d'onda di riferimento in grado di rilevare la positività "di fondo".

RISULTATI

Classificazione dei campioni

Le caratteristiche relative alla neoplasia, alla presenza o assenza di macro o micro metastasi, alle condizioni generali dei soggetti e al follow up sono riportate in tabella 1.

Messa a punto del metodo

Le prove preliminari hanno mostrato che il donatore ideale di NeuAc, che permette una migliore standardizzazione dei risultati, è il CMPNeuAc e che la concentrazione ottimale di campione da utilizzare è pari al 25% del volume totale.

Analisi dei sieri sani e patologici

Dopo incubazione senza CMPNeuAc la lectina SNAI ha mostrato la maggiore reattività, senza differenze significative tra la D.O. rilevata in controlli (MAA = 0,82 \pm 0,05; SNAI = 3,82 \pm 0,16) e soggetti patologici (MAA = 0,79 \pm 0,04; SNAI = 3,80 \pm 0,12).

In presenza di CMPNeuAc nei cani sani l'attività di MAA aumenta e quella di SNAI diminuisce, mentre nei cani patologici l'aumento di attività MAA è meno evidente (tabella 2). L'analisi dei dati individuali evidenzia, oltre a una forte variabilità individuale, che nel cane con metastasi l'attività ST α 2,3 cala invece che aumentare.

Analisi dei tessuti

L'analisi di omogeneati di tessuto ha presentato risultati variabili, a volte anche tra diverse parti dello stesso tumore. In linea generale è sempre

presente una maggiore quantità di Sial- α 2,6 e una bassa attività ST α 2,3. La prevalenza di sialilazione α 2,6 è stata rilevata anche mediante immunomarcatura, anche in questo caso con forti variabilità tra i diversi campioni o tra diverse sezioni dello stesso campione (tabella 2). La reattività di MAA è sempre risultata ottimale, con poco fondo e positività concentrate a livello perinucleare e/o nel lume di strutture tubulari o duttali mentre quella di SNAI evidenziava forte colorazione di fondo (aspecifica o dovuta a diffusione di proteine sieriche nel connettivo), positività perinucleari e/o intraluminari.

DISCUSSIONE

La maggiore reattività basale di SNAI suggerisce che, indipendentemente dalla presenza di tumori, le proteine sieriche sono prevalentemente sialilate in posizione α 2,6. Mentre nei cani sani l'attività ST α 2,3 è prevalente, in quelli con neoplasie l'equilibrio si sposta verso l'attività ST α 2,6. Ciò è particolarmente evidente nel cane con metastasi: ciò può dipendere sia dalla presenza del tumore che dallo stato generale scadente di questo cane (ma in tal caso ci si aspetterebbe una diminuzione anche dell'attività ST α 2,6).

L'analisi dei tessuti ha mostrato, indipendentemente dal tipo di test (valutazione del tipo di NeuAc, attività sialiltrasferasica o immunomarcatura) un comportamento variabile, anche tra diverse parti dello stesso tumore, probabilmente in funzione di caratteristiche istologiche diverse, diverso rapporto tra tessuto mammario e stroma o diversa dimensione dei singoli campioni di tessuto. Nei tessuti neoplastici sembra però prevalere Sial- α 2,6 mentre Sial- α 2,3 e la corrispondente attività ST α 2,3 tendono ad essere poco rappresentati.

CONCLUSIONE

Questo lavoro ha permesso di ottimizzare per l'utilizzo nel cane un metodo di valutazione dell'attività ST. Le proteine del siero di cane sono prevalentemente sialilate in posizione α 2,6, sia in presenza che in assenza di tumore, nonostante l'attività ST α 2,3 sia maggiore nei soggetti sani che in quelli con tumore, nei quali l'equilibrio tra i due enzimi si sposta verso ST α 2,6. Nei tessuti neoplastici prevalgono proteine sialilate in posizione α 2,6 ed attività ST α 2,6, soprattutto in cani con metastasi e condizioni generali scadenti, ma l'analisi di campioni di tessuto deve essere

verificata standardizzando i prelievi in modo da ottenere campioni il più possibile simili tra loro. Nell'insieme, tali risultati suggeriscono che anche nel cane i tumori maligni sono associati ad aumenti di sialilazione $\alpha 2,6$ e a maggiore attività dalla ST $\alpha 2,6$.

BIBLIOGRAFIA

- Dall'Olio F, et al. 1989. Increased CMP-NeuAc:Gal beta 1,4GlcNAc-R alpha 2,6 sialyltransferase activity in human colorectal cancer tissues. *Int J Cancer*, 44:434-9
- Dixit M, et al. 1988. Plasma sialyltransferase as a tumor marker, *Cancer detection and prevention*. 11:191-6
- Henderson M e Kessel D. 1997. Alteration in plasma sialyltransferase levels in patients with neoplastic disease. *Cancer* 39:1129-34
- Narayanan S. 1994. Sialic acid as a tumor marker, *Ann Clin Lab Sci* 24:376-84
- Rossi G e Paltrinieri S. 2009. Total sialic acid (TSA): An acute phase reactant in cats with a possible role in feline coronavirus infection. *Can J Vet Res* 73:144-50
- Yeh J e Cummings JC. 1996. Absorbance- and Light-Based Solid-Phase Assays for CMPNeuAc:Gal β 1-4GlcNAc-R α -2,3-Sialyltransferase. *Anal Biochem* 236:126-33

6.

	1	2	3	4
Numero di neoplasie	Multiple	Multiple	Multiple	Singola
Condizione generale (clinica e sulla base dei reperti di laboratorio)	Scadente	Buona	Buona	Buona
Macrometastasi	Si	No	No	No
Tipo di tumore	Maligno	Maligno + benigni	Maligno	Maligno
Micrometastasi	Non ricercate	No	No	Si
Follow up	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo

Tabella 1: tabella riassuntiva delle caratteristiche dei soggetti patologici inclusi nella presente tesi.

CONTROLLI			PATOLOGICI		
N° cane	MAA	SNAI	N° cane	MAA	SNAI
C1	82,0	-6,5	P4	-19,1	-4,2
C2	91,7	-6,6	P5	10,5	0,5
C3	4,0	-4,2	P6	41,7	-9,0
			P7	16,2	-1,8
Media \pm DS	59,20 \pm 48,07	-5,76 \pm 1,39	Media \pm DS	12,33 \pm 24,98	-3,64 \pm 4,03

Tabella 2: Valori individuali e media \pm DS rilevata nei sieri dei controlli e dei cani patologici inclusi nella presente tesi. I valori sono espressi in termini di incremento o decremento percentuale rispetto alla D.O. basale.

Cane n°	massa	MAA	MAA	SNAI	
C1	Bianco reattivo	2,5	--	3,5	--
	Sano	29,6	--	6,5	--
	I-II-Sx	-5,7	Tessuto connettivo	9,7	Tessuto connettivo
	II/III Sx	97,3	Rare cellule, Debole positività	0,0	Debole positività (50% delle cellule)
	ascell Dx	66,2	Debole positività in cellule tubulari	0,2	Debole positività in cellule tubulari
P4	I Sx – a	13,9	Non interpretabile	-23,2	Non interpretabile
	I Sx – b	-17,2	Negativo	9,3	Negativo
	Sx cran – a	-16,7	Rare cellule debolmente positive	-5,1	Negativo
	II Sx – a	-8,5	Cellule negative	-7,5	Rare positività sul bordo dei tubuli
	II Sx –b	-24,6	Cellule negative	26,3	Rare positività in cellule tubulari
	Sx cran – b	-12,0	Cellule negative	4,8	Alcune cellule debolmente positive
	Camp 1	-12,2	Rare cellule tubulari	-0,3	positive il 50% delle cellule
P5	Camp 2	-29,8	Non interpretabile	35,2	Non interpretabile
	I Sx	-17,0	Rare e deboli positività in cell. Tubulari	8,7	Rare positività molto evidenti
P6	II Sx	-10,5	Rare e deboli positività in cell. Tubulari	8,5	Rare positività molto evidenti
	V Dx	-25,4	Rare cell positive sparse	17,7	Cellule basali dei dotti positive

Tabella 3: Valori rilevati nelle singole sezioni di tessuto. Sono espressi sia i valori di incremento o decremento percentuale rispetto alla D.O. basale rilevata in ELISA sia le caratteristiche di positività dopo immunocolorazione.

PRELIMINARY RESULTS ON SIALYLTRANSFERASE ACTIVITY IN SERUM AND TISSUES OF HEALTHY DOGS AND OF DOGS WITH MAMMARY TUMORS

In humans, the presence of metastatizing tumors is associated with α 2,6-linked sialic acid (Sial) on membrane glycoproteins and in serum, while non-metastatizing tumors express α 2,3-Sial. In turn, the type of Sial depends on the activity of the enzyme sialyltransferase (ST). The aims of this study were to validate a method to evaluate ST activity in canine serum and tissues and to drawn preliminary information on these parameters in dogs with and without mammary tumors. To this aim, microtiter plates were coated with asialyated molecules. Sial-donors (CMP-NeuAc) and serum or homogenated tissues were added to each well: ST- α 2,6 or ST- α 2,3 activity was detected using biotinylated lectins to quantify the amount of α 2,6-Sial (lectin SNAI) or α 2,3-Sial (lectin MAA), respectively. These lectins were also used to asses the baseline amount of Sial (without CMP-NeuAc) and to stain tissue sections to detect which type of Sial was mainly present.

After validation of the method, the analysis of sera from 3 healthy dogs revealed a prevalent ST- α 2,3 activity, since the amount of α 2,3-Sial, less abundant than α 2,6-Sial in baseline conditions, increased in the presence of CMP-NeuAc. The ST- α 2,3 activity was low in pathological sera, especially in a dog with metastasis, suggesting that the equilibrium between ST- α 2,6 and ST- α 2,3 activity shifts toward the former, as reported in humans. This hypothesis is supported by the results of omogeneated tissues (which had a high variability even within the same tumour) and by the high expression of α 2,6-Sial in tissue section.

Key words: sialyltransferase, sialic acid, mammary tumour

COLIBACILLOSI DEL VITELLO: INDAGINE MORFOLOGICA ED IMMUNOFENOTIPICA SULLA DISTRIBUZIONE DI *ESCHERICHIA COLI* IN RELAZIONE ALLO STATO IMMUNITARIO DI VITELLI DECEDUTI IN CORSO DI PATOLOGIA ENTERICA SPONTANEA

Rondena Marco, Binanti Diana, Morandi Nicola*, Pollera Claudia, Finazzi Mario, Riccaboni Pietro

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

Nei vitelli deceduti in corso di enterite neonatale non raro è il riscontro istologico di notevole deplezione del sistema linfoide mucosa – associato (GALT). Tale reperto è ritenuto da alcuni un fattore importante nell'insorgenza e nel decorso della malattia. Lo studio delle lesioni a carico del GALT, tuttavia, può presentare problemi interpretativi se condotto su animali convenzionali trattati con farmaci ed antibiotici che possano influenzare in modo deciso il decorso della patologia. La presente comunicazione riguarda 14 vitelli di razza Jersey provenienti da un allevamento di tipo biologico, in cui non sono utilizzati farmaci, deceduti spontaneamente e sottoposti a necropsia, durante la quale sono stati prelevati campioni per indagini microbiologiche ed istologiche con tecniche routinarie ed immunoistochimiche con anticorpi anti CD3, CD79, MHC e *Heat Shock Proteins* (HSPs) 72 e 27. Alla batteriologia, costante l'isolamento di *Escherichia coli* (Ec). Istologicamente era evidente grave iperemia ed enterite catarrale diffusa a tutto il tenue, grave immunodeplezione delle placche di Peyer, dei linfonodi mesenterici e splenici. Immunostochimicamente si notava grave riduzione delle cellule CD 79+ nei centri follicolari dei tessuti linfoidei, con infiltrazione da parte di cellule macrofagiche MHC II positive. L'espressione di HSPs si mostrava intensa sia a livello citoplasmatico nell'epitelio enterico, sia a livello delle cellule presentanti l'antigene (APC) nei tessuti linfoidei. I reperti di immunodeplezione descritti sembrano aver avuto un importante ruolo nella gravità delle lesioni riscontrate, in particolare, ulteriori approfondimenti sono necessari per stabilire l'eventuale presenza di altri patogeni batterici e virali, nonché, visto il costante isolamento, l'interazione di Ec e delle eventuali tossine da esso prodotte con le cellule epiteliali intestinali e del GALT.

Parole chiave: allevamento biologico, vitello, enterite, *E. coli*, immunità naturale

CALF COLIBACILLOSIS IN BIO HERD: MORPHOLOGICAL AND IMMUNOPHENOTIPICAL FINDINGS IN SPONTANEOUS *E. COLI* ENTERIC DISEASE

Neonatal calf enteritis is constantly associated to depletion of gut-associated lymphoid tissue (GALT). The aim of these study is to evaluate GALT lesions in 14 calves from a bio herd, where no drugs are admitted. These calves were necropsied and samples were taken for microbiological examination, with constant *Escherichia coli* (Ec) isolation, histological and immunohistochemical investigations, these later by means of antibodies against CD3, CD79, and MHC II, Heat Shock Proteins (HSPs) 72 and 27. Severe hyperemia and catarrhal enteritis, severe immunodepletion of the Peyer plaques, lymph nodes and spleen were histologically evident.

Immunohistochemically reduced numbers of CD 79+ cells in follicular centres of lymphoid tissue, admixed with macrophages MHC II positive (APC) were detectable. Intense cytoplasm expression of HSPs in enterocytes and APC resident in lymphoid tissues was also evident.

Immunodepletion finding appeared to have an important role in the severity of the described lesions, therefore further studies are needed to determine the possible presence and role of other bacterial and viral pathogens, the interaction between Ec, intestinal epithelial cells and GALT to better understand host pathogen balance.

Key words: bio herd, calf, enteritis, *E. coli*, natural immunity

CLASSIFICAZIONE E PREVALENZA DI LESIONI INTRAEPITELIALI MAMMARIE NEL CANE IN ASSENZA DI NEOFORMAZIONI CLINICAMENTE PALPABILI

Mouser Pamela, Miller Margaret A., Antuofermo Elisabetta, Badve Sunil S., Mohammed Sulma I.

Department of Comparative Pathobiology (PM, MAM, SIM) and Purdue Cancer Center (SIM), Purdue University, West Lafayette, IN; Department of Pathology and Veterinary Clinic (EA), Sassari University, Italy; and Department of Pathology and Laboratory Medicine (SSB), Indiana University, Indianapolis, IN

Le lesioni mammarie intraepiteliali (IELs) sono proliferazioni non invasive che includono l'iperplasia duttale (DH), l'iperplasia duttale atipica (ADH), e il carcinoma duttale *in situ* (DCIS). Nelle donne, la presenza di IELs è associata ad un aumento del rischio di insorgenza del carcinoma mammario invasivo. Il tumore mammario è la neoplasia più comune nelle cagne e le IELs si riscontrano frequentemente in mammelle neoplastiche e in mammelle in assenza di tumore.

Scopo del nostro studio è stato quello di valutare la prevalenza di IELs in 108 cagne non mostranti lesioni mammarie clinicamente palpabili. All'interno di questa popolazione, 56 cagne (52%) mostravano almeno un tipo di IELs, classificate come: DH (49 cani), ADH (14 cani), DCIS di grado basso (19 cani), DCIS di grado intermedio (12 cani) e DCIS di grado alto (1 cane). In 21 cani erano presenti due o più differenti tipi di IELs. In 23/24 soggetti mostranti IELs atipiche (ADH o DCIS) è stata effettuata una indagine immunohistochimica (IHC) al fine di valutare l'espressione per gli estrogeni (ER- α), per il progesterone (PR), per il fattore di crescita epidermico (HER-2/*neu*) e per il Ki-67. Il DCIS di grado basso ha mostrato per tutti i recettori una positività sensibilmente inferiore a quella riscontrata nell'adiacente tessuto mammario privo di lesioni. Sono risultate ER- α negative 61 lesioni (12 ADH, 36 DCIS di basso grado, 13 DCIS di grado intermedio), e nessuna di queste risultava over-esprimere HER-2/*neu*. La specie canina dimostra di essere un modello ideale per lo studio delle lesioni preinvasive mammarie della donna sulla base dell'elevata frequenza di IELs riscontrate e per la notevole somiglianza tra i quadri istologici delle stesse nelle due specie.

Parole chiave: modello animale, cane, lesioni intraepiteliali, ghiandola mammaria, preneoplasia

PREVALENCE AND CLASSIFICATION OF SPONTANEOUS MAMMARY INTRAEPITHELIAL LESIONS IN DOGS WITHOUT CLINICAL MAMMARY DISEASE

Mammary intraepithelial lesions (IELs) are noninvasive epithelial proliferations that include ductal hyperplasia (DH), atypical ductal hyperplasia (ADH) and ductal carcinoma *in situ* (DCIS). In women, IELs are associated with increased risk of invasive breast cancer. Mammary neoplasia is the most common malignancy in female dogs and IELs are common both in tumor-bearing glands and in non-tumor-bearing glands. In a study of 108 female dogs without clinical mammary disease, mammary glands were evaluated histologically to determine the prevalence of IELs. Within this population, 56 dogs (52%) had at least one type of spontaneous IEL including DH (49 dogs), ADH (14 dogs), low-grade DCIS (19 dogs), intermediate-grade DCIS (12 dogs), and high-grade DCIS (1 dog). Twenty-one dogs had two or more different IEL types. In 23 of 24 dogs with atypical IELs (ADH or DCIS), immunohistochemical expression of estrogen receptor (ER- α), progesterone receptor (PR), human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2/*neu*), and Ki-67 was semi-quantitatively scored. For all IHC markers, low-grade DCIS had significantly lower scores than adjacent nonlesional gland. Sixty-one lesions were ER- α negative (12 ADH, 36 low-grade DCIS, 13 intermediate-grade DCIS), and no lesions over-expressed HER-2/*neu*. The dog shows promise as a model for human breast preneoplasia based on its prevalent spontaneous mammary IELs and the remarkable histological similarity between canine and human IELs.

Key words: animal model, canine, intraepithelial lesions, mammary gland, preneoplasia