

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO
FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA

SCUOLA DI DOTTORATO
Sanità e Produzioni Animali: Scienza, Tecnologia e Biotecnologie

Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità' Pubblica Veterinaria
Sezione di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviare

Dottorato di Ricerca In Igiene Veterinaria e Patologia Animale
XXIV Ciclo

**PATOLOGIE INFIAMMATORIE CRONICHE CUTANEE E MUCOSALI
NELLA SPECIE FELINA
(PATOGENESI E RUOLO DI ANTIGENI EZIOLOGICI VIRALI)**

Vet 03

Tesi di: Dott. Paola Persico
Matricola n. R08116

Docente guida: Prof.ssa Paola Roccabianca

Coordinatore: Prof. Claudio Genchi

A.A. 2010/2011

Indice

Introduzione	pag. 5
Scopo e risultati	pag. 6
1. Herpesvirosi cutanea e mucosale felina	pag. 7
1.1 Eziologia: generalità sulla famiglia Herpesviridae	pag. 8
1.2 Epidemiologia e patogenesi di FHV-1	pag. 11
1.3 Manifestazioni cliniche dell'infezione da FHV-1	pag. 13
1.4 Lesioni macroscopiche cutanee dell'infezione da FHV-1	pag. 15
1.5 Diagnosi	pag. 18
1.5.1 Metodiche diagnostiche per la ricerca di FHV-1 nella cute di gatti con lesioni dermatologiche	pag. 18
1.5.1.a Reazione a catena della polimerasi	pag. 18
1.5.1.b Isolamento virale	pag. 19
1.5.1.c Tecniche immunologiche	pag. 19
1.5.1.d Esame citologico	pag. 20
1.5.1.e Esame istopatologico cutaneo	pag.20
1.6 Obiettivi dello studio	pag. 23
1.7 Materiali e metodi	pag. 23
1.7.1 Valutazione istopatologica	pag. 23
1.7.2 Tecnica di biologia molecolare classica (PCR) seguita per l'identificazione di FHV-1	pag. 24
1.7.3 Tecnica di immunistochimica per l'identificazione di FHV-1	pag.25
1.8 Risultati	pag. 26
1.9 Discussione	pag. 30

2. Complesso gengivite-stomatite-faringite

linfoplasmacellulare felina	pag. 33
2.1 Generalità sul complesso “gengivite-stomatite-faringite cronica felina”	pag. 34
2.2 Eziologia e patogenesi	pag. 35
2.3 Obiettivi dello studio	pag. 40
2.4 Materiali e metodi	pag. 40
2.4.1 Valutazione istopatologica	pag. 40
2.4.2 Tecnica di immunisto chimica	pag. 41
2.4.3 PCR per clonalità	pag. 41
2.5 Risultati	pag. 44
2.6 Discussione	pag. 55

3. Granuloma collagenolitico lineare felino

3.1 Le malattie correlate al complesso del granuloma eosinofilo felino (CGE)	pag. 60
3.2 Eziopatogenesi del CGE	pag. 60
3.3 Aspetti clinici e diagnostici generali del CGE	pag. 64
3.4 CGE felino e Sindrome di Wells'umana	pag. 67
3.5 Granuloma collagenolitico lineare	pag. 68
3.6 Lesioni macroscopiche	pag. 68
3.7 Reperti istopatologici	pag. 70
3.8 Obiettivi dello studio	pag. 72
3.9 Materiali e metodi	pag. 72
3.9.1 Esame istopatologico	pag. 73
3.9.2 Immunisto chimica per l'identificazione di CD31 e FVIII	pag. 73
3.10 Risultati	pag. 74
3.11 Discussione	pag. 79

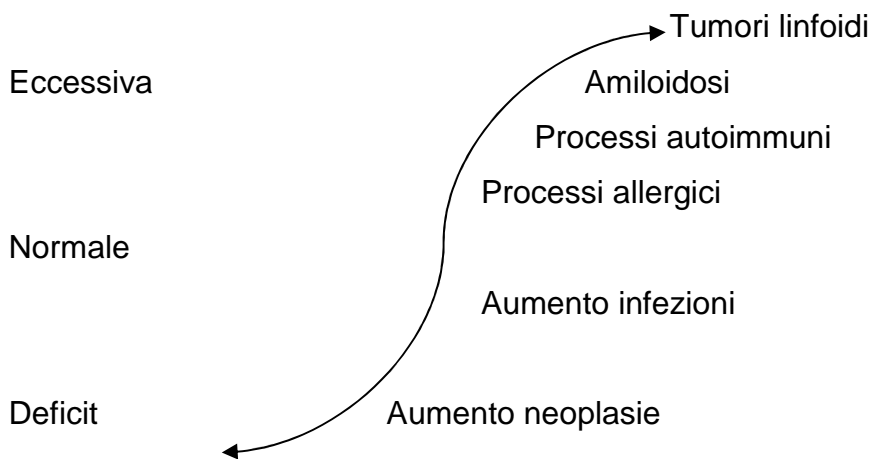
4 Bibliografia	pag. 82
5 Pubblicazioni relative al dottorato	pag. 93
6 Relazioni relative al dottorato	pag. 94
7 Altre pubblicazioni e relazioni nel triennio 2008-2010	pag. 94

Introduzione

Il sistema immunitario gioca un ruolo essenziale nel mantenimento delle condizioni generali di salute e nella resistenza alle malattie.

Diversi fattori, ambientali ed ereditari, possono determinare una disfunzione/mancanza di regolazione del sistema immunitario e causare un deficit o un eccesso nella risposta ad antigeni esterni o interni all'organismo stesso.

Risposta immunitaria dell'organismo (Tizard *et al.* modificato):



Il gatto tende a sviluppare patologie croniche, in cui si evidenzia istologicamente un infiltrato linfoplasmacellulare, che si possono manifestare clinicamente con riniti, cheratocongiuntiviti, gengivostomatiti, pododermatiti, lesioni cutanee erosivo ulcerative a localizzazione variabile. Queste patologie possono subire una trasformazione clonale e poi neoplastica soprattutto nei processi cronici, caratterizzata spesso da un'ipergammaglobulinemia sierica.

Le malattie infiammatorie croniche cutanee e mucosali nella specie felina rappresentano un problema clinico perché: sono patologie persistenti-ricidivanti, con poca risposta alla terapia, che possono andare incontro ad una trasformazione neoplastica, ad eziologia multifattoriale, poco caratterizzate da un punto di vista istologico, immunologico e patogenetico.

Scopo e risultati

Lo scopo del presente dottorato è stato quello di valutare la patogenesi e il ruolo di antigeni eziologici in alcune malattie croniche e/o recidivanti della specie felina con particolare attenzione a herpesvirosi, stomatiti linfoplasmacellulari e malattie correlabili al complesso del granuloma eosinofilo lineare felino.

Le patologie riconducibili a quadri di “prurito testa collo”, “malattie correlabili al complesso del granuloma eosinofilo” e/o stomatite linfoplasmacellulare rappresentano delle problematiche frustranti per il Medico Veterinario in quanto vanno incontro a recidive frequenti, a non risposta terapeutica e a cronicizzazione con, in alcuni casi, evoluzione neoplastica.

Sulla base del lavoro svolto è stato possibile:

- caratterizzare istologicamente le dermatiti ulcerative da herpes virus felino di tipo 1 e di valutare l’attendibilità di due metodi diagnostici (PCR e immunoistochimica)
- descrivere l’istologia e la possibile eziologia delle gengivostomatiti linfoplasmacellulari feline
- spiegare l’aspetto macroscopico correlato al quadro istologico del complesso del granuloma collagenolitico lineare

L’identificazione della possibile eziologia virale, la descrizione del quadro istopatologico e/o la caratterizzazione del deficit o dell’eccesso della risposta immunitaria muco-cutanea possono essere considerate un valido supporto all’approccio diagnostico, terapeutico e prognostico delle malattie infiammatorie croniche cutanee e mucosali nella specie felina.

CAPITOLO I

HERPESVIROSI CUTANEA E MUCOSALE FELINA

1.1 Etiologia: generalità sulla famiglia Herpesviridae

Numerosi herpesvirus sono stati identificati in mammiferi, uccelli, rettili, anfibi, insetti e molluschi. Gli herpesvirus sono virus endonucleari, di grandezza compresa tra i 100-200 nm con DNA a doppio filamento e nucleocapside a simmetria icosaedrica. Il virione è circondato da un envelope contenente lipidi e glicoproteine. Il virus, per le sue caratteristiche strutturali, è etere-sensibile e termolabile. Il ciclo biologico della replicazione virale è caratteristico dei virus a DNA a doppio filamento (Davison AJ, 2005; Zanella A, 1991; Wildy P, 1973). La fase di replicazione utilizza una RNA-polimerasi cellulare e il processo di trascrizione porta alla formazione di proteine strutturali aggregate nel nucleo.

Gli herpesvirus hanno la caratteristica di persistere per tutta la vita nei tessuti dell'ospite, malgrado la presenza di anticorpi circolanti, stabilendo così un'infezione latente. La classificazione tassonomica è sottoposta a continua revisione. Gli herpesvirus sono attualmente divisi in tre sottofamiglie: α , β e γ (Davison AJ, 2005; ICVT, 2007).

Gli α -herpesviridae (Tabella 1) vengono definiti virus neurotropi per la caratteristica di risiedere, in forma episomale nei nervi craniali o nei gangli spinali.

Sono responsabili di lesioni prevalentemente litiche a carico della mucosa di labbra, apparato respiratorio, genitale, occhi e cute (Davison AJ, 2005). Possiedono un elevato tropismo cellulare e il loro principale effetto è indurre lesioni caratterizzate da necrosi tissutale (Tabella 2).

I β -herpesviridae stabiliscono un'infezione latente a livello di diversi tessuti tra cui le cellule epiteliali delle ghiandole secretorie (soprattutto ghiandole salivari), rene e linfonodi (Tabella 2). Le cellule infettate presentano dei corpi inclusi molto grandi e possono andare incontro a lisi per la replicazione virale e la risposta del sistema immunitario dell'ospite (Davison AJ, 2005; Roizman B, 1981).

I γ -herpesviridae (detti anche herpesvirus linfotropici) instaurano un'infezione latente nelle cellule linfoidi, soprattutto linfociti B e T (Tabella 2). Il prototipo è il virus di Epstein-Barr che rappresenterebbe un possibile modello sperimentale per lo studio dell'eziologia virale di alcuni tipi di tumore nell'uomo (Davison AJ, 2005; Roizman B, 1981).

Tabella 1 Classificazione dei principali α -herpesvirus suddivisi in genere, nome del virus e ospite piú frequente (Davison AJ, 2005; ICVT, 2007).

Famiglia Herpesviridae, sottofamiglia α-herpesvirinae		
Genere	Virus	Ospite
Iltovirus	Herpesvirus pollo 1	Pollo
Mardivirus	Herpesvirus pollo 2-3	Pollo
Simplexvirus	Herpesvirus bovino 2	Bovino
	Herpesvirus cercopiteco 1- 2- 16	Macaco
	Herpesvirus umano 1- 2	Uomo
Varicellovirus	Herpesvirus bovino 1- 5	Bovino
	Herpesvirus bufalo 1	Bufalo
	Herpesvirus canino 1	Cane
	Herpesvirus caprino 1	Capra
	Herpesvirus cercopiteco 9	Primati
	Herpesvirus cervo 1-2	Cervo
	Herpesvirus equino 1-3-4-8-9	Equini
	Herpesvirus felino 1	Felini
	Herpesvirus umano 3	Uomo
	Herpesvirus foca 1	Foca
Non assegnato	Herpesvirus psittacidi 1	Psittacidi

Tabella 2: Esempi di herpesvirus responsabili di malattie, segni clinici e ospiti principali

Virus	Malattia e/o segni clinici riconducibili	Ospiti
α- herpes virus		
Herpes simplex 1, 2	Lesioni a labbra, mucosa orale, cute esofago e congiuntiva (Herpes simplex 1), ai genitali esterni (Herpes simplex 2). Gruppi di vescicole che possono esitare in erosioni e/o ulcere	Uomo
Herpesvirus canino 1	Infezione sistemica necrotizzante nei cuccioli, vie aeree superiori negli adulti	Cane
Herpesvirus suino 1	Pseudorabies, Aujeszky's	Suini
Herpesvirus bovino 1-5	Rinotracheite infettiva del bovino, vulvovaginite pustolosa, balanopostite, aborto virale	Bovini
Herpesvirus equino 1-4	Aborto virale, rinopneumonite virale, morte neonatale, malattie neurologiche, enterocoliti, esantema coitale	Equini
Herpesvirus equino 3	Pustole, vescicole, erosioni e ulcere a livello di vagina, vulva, perineo, pene e prepuzio	Equini
Herpesvirus felino 1	Herpes felino	Felini
Herpesvirus dei volatili 1-3	Laringotracheiti	Pollo
β-herpes virus		
Citomegalovirus Muromegalovirus Roseolovirus		Uomo, bovini, suini, equini, api, scimmie, topi, ecc.
γ-herpesvirus		
Epstein-Barr virus	Mononucleosi infettiva	Uomo
Marek virus	Malattia di Marek	Pollo

1.2 Epidemiologia e patogenesi di FHV-1

Herpesvirus felino di tipo-1 (felid herpesvirus 1, FeHV-1, FHV-1) è un virus appartenente alla sottofamiglia degli α -herpesviridae (Davison AJ, 2005; ICVT, 2007; Van Regenmortel MHV *et al.*, 2000) e sembra caratterizzato da epiteliotropismo. FHV-1 è strettamente correlato all'herpesvirus del cane (Canid herpesvirus 1, CHV-1) (Rota PA, 1990; Willoghby K *et al.*, 1999), della foca (Phocid herpesvirus 1, PHV-1) (Willoghby K *et al.*, 1999; Harder TC *et al.*, 1996; Lebich M *et al.*, 1994; Gaskell R, 2006) e del cavallo (Equid herpesvirus 1-3-4-8-9) (Willoghby K. *et al.*, 1999; Gaskell R, 2007).

FHV-1 ha una doppia catena di DNA, circondata da un capsidico icosaedrico e protetta da un tegumento proteico e da un envelope che contiene almeno dieci glicoproteine differenti (Gaskell R, 2007).

Il virus è inattivato a temperature di 37°C per 3 ore ed è molto sensibile all'effetto dei comuni antisettici (Eleraky NZ *et al.*, 2002). Alle basse temperature può rimanere infettivo per 5 mesi (154 giorni a 4°C) (Donaldson AL *et al.*, 1976).

Il gatto domestico sembra rappresentare l'ospite d'elezione di FHV-1 anche se è stato isolato da altri felini quali leoni, ghepardi e puma (Gaskell R, 2007; Junge RE *et al.*, 1991). Diversi studi hanno dimostrato che la prevalenza d'infezione da FHV-1 nella popolazione felina è pari al 10-20% (Gaskell R, 2007; Binns SH *et al.*, 2000; Helps CR *et al.*, 2005; Pedersen NC *et al.*, 2004; Gaskell RM *et al.*, 1979) e tale percentuale aumenta nelle colonie e nei gattili fino al 50%-80% (Pedersen NC *et al.*, 2004).

La trasmissione di FHV-1 avviene per contatto diretto tramite secrezioni oculo-congiuntivali, orali e respiratorie emesse da animali infetti (Gaskell RM *et al.*, 1979; Gaskell RM *et al.*, 1982). FHV-1 una volta penetrato nell'organismo infetta le cellule epiteliali provocando delle lesioni a carattere necrotizzante. Sperimentalmente l'infezione da FHV-1 può essere indotta inoculando il virus nella vagina di gatte gravide provocando la malattia nei cuccioli con, in casi sporadici, aborto spontaneo (Bittle JL *et al.*, 1971). I gattini si infettano con FHV-1 prima della vaccinazione e i segni clinici variano in rapporto al livello di anticorpi materni (Johnson RP, 1985). Se la concentrazione di anticorpi materni è alta sono protetti dalla malattia ma possono sviluppare infezioni latenti; se il livello anticorpale è basso si ha la comparsa dei segni clinici (Gaskell RM *et al.*, 1982; Johnson RP, 1985).

Superata l'infezione naturale da FHV-1 si può instaurare un'immunità che non protegge però dall'infezione (Gaskell R, 2007; Gaskell RM *et al.*, 1979).

L'escrezione del virus inizia dopo 24 ore dall'infezione e continua per 1-3 settimane (Gaskell R, 2007; Johnson RP, 1985; Pedersen NC, 1987; Vogtlin A *et al.*, 2002; Weigler BJ *et al.*, 1997).

La malattia può avere un decorso acuto risolvendosi in 10-14 giorni o può presentarsi in forma cronica con lesioni delle vie aeree superiori e dei tessuti oculari.

L'infezione è caratterizzata da una fase primaria, da una di latenza neuronale e da un'infezione ricorrente con la riattivazione del virus (Davison AJ *et al.*, 2005; Gaskell R, 2007; Pedersen NC, 1987). Nella fase primaria FHV-1 penetra nelle terminazioni nervose dell'epidermide e, per via centripeta, giunge ai neuroni sensoriali e ai rispettivi gangli, soprattutto nel trigemino. In questa sede si moltiplica e colonizza le cellule epiteliali da essi innervate. FHV-1 integra il proprio DNA a quello dei neuroni dell'ospite e, in forma episomale, stabilisce un'infezione latente (fase di latenza neuronale) che può durare tutta la vita dell'ospite (Gaskell R, 2007; Hargis AM *et al.*, 1999; Nasisse MP *et al.*, 1989; Gross TL *et al.*, 2005). La fase di latenza virale è associata a molti virus appartenenti alla famiglia degli herpes virus (Johnson LR *et al.*, 2005; Tobley *et al.*, 2005) ed è caratterizzata da un basso ma persistente livello di attività trascrizionale (Johnson LR *et al.*, 2005; Khanna KM *et al.*, 2004) e minima capacità di assemblare le particelle virali (Lang A *et al.*, 2009; Thompson RL *et al.*, 2000) che mantiene la risposta immunitaria dell'ospite (Sawtell NM *et al.*, 1998) e il controllo delle recidive (Parzefall B *et al.*, 2010; Sussman MD *et al.*, 1997).

Alcuni stimoli, forse correlati a malattie e stress (Gaskell R, 2007), attivano il virus latente che entra in replicazione e viaggia lungo la fibra nervosa sensitiva, fino alle giunzioni neuroepiteliali (riattivazione del virus). La migrazione di FHV-1 nelle fibre nervose sembra permettergli di sfuggire all'azione degli anticorpi dell'ospite.

L'esatto meccanismo patogenetico responsabile delle lesioni cutanee da FHV-1 non è ancora stato chiarito del tutto (Gaskell R, 2007; Stiles J, 2003; Maggs DJ, 2005; Holland JL *et al.*, 2006).

L'azione patogena e le relative manifestazioni cliniche di FHV-1 sembrano essere dovute a due meccanismi principali: l'effetto citolitico e l'effetto immuno-mediato indotti dal virus. Il primo si realizza nel corso dell'infezione primaria o durante la riattivazione (Stiles J, 2003; Maggs DJ, 2005). Alla base dell'effetto citolitico vi è la "lisi cellulare" causata dall'attiva replicazione virale. L'effetto citolitico è responsabile

delle manifestazioni cliniche erosive a carico della cute ma anche di altri tessuti dell'organismo ospite come cornea e mucosa nasale. L'effetto immunomediato è caratterizzato da una bassa attività replicativa virale e dall'infiltrazione di cellule infiammatorie, soprattutto linfociti, nei tessuti interessati dal virus (Stiles J, 2003; Maggs DJ, 2005; Holland JL *et al.*, 2006).

1.3 Manifestazioni cliniche dell'infezione da FHV-1

L'herpesvirus felino di tipo-1 (FHV-1) è un Alphaherpesvirus (ICTV, 2007) con tropismo epiteliale responsabile di malattie respiratorie e oculari come riniti acute e croniche (Binns SH *et al.*, 2000; Hoover EA *et al.*, 1970; Johnson LR *et al.*, 2005), cheratocongiuntiviti ulcerative (Nasisse MP *et al.*, 1989; Bodle JE, 1976; Bistner SI *et al.*, 1971; Andrew SE, 2001; Allgoewer I *et al.*, 2001), sequestri corneali (Nasisse MP *et al.*, 1998; Cullen CL *et al.*, 2005), cheratocongiuntiviti eosinofile (Nasisse MP *et al.*, 1998), uveiti anteriori (Maggs DJ *et al.*, 1999), stomatiti (Hargis AM *et al.*, 1997; Hargis AM *et al.*, 1999), dermatiti facciali e nasali ulcerative (Hargis AM *et al.*, 1999; Holland JL *et al.*, 2006; Johnson RP *et al.*, 1971; Flecknell PA *et al.*, 1979; Gross TL *et al.*, 2005; Westermeyer HD *et al.*, 2009) (Tabella 3).

E' normalmente confinato alle vie aeree superiori e agli occhi. I segni clinici respiratori hanno un periodo d'incubazione di 2-6 giorni. Nelle sindromi respiratorie delle vie aeree superiori l'infezione da FHV-1 spesso è concomitante al riscontro di *Calicivirus* e/o *Chlamydomphila felis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Mycoplasma* spp, *Staphylococcus* spp. ed *Escherichia coli* (Helps C *et al.*, 2003; Gaskell R, 2006). I segni clinici iniziali della malattia includono depressione, starnuti, inappetenza e febbre, seguiti da secrezioni sierose nasali e oculari. Questi possono accompagnarsi a salivazione eccessiva, correlata alla stomatite e a scolo oculo-nasale inizialmente sieroso, che può diventare purulento per la presenza di infezioni batteriche secondarie. Le lesioni al cavo orale sono rappresentate da ulcere ramificate e vescicole, accompagnate da ampie aree di necrosi e localizzate sul palato molle, sulla superficie dorsale della lingua e a livello delle fauci, si possono avere parodontiti e perdita dei denti (Hargis AM, 1999; Stiles J, 2003; Gaskel R, 2007; Westermeyer HD *et al.*, 2009).

In aggiunta a queste lesioni direttamente provocate dal virus, FHV-1 ha un ruolo indiretto nella patogenesi della gengivostomatite linfoproliferativa felina, alterando il

sistema immunitario del cavo orale dell'ospite e facilitando così le flogosi indotte dai batteri opportunisti e non con conseguente peggioramento delle lesioni (Hargis AM, 1999; Suchy A *et al.*, 2000). Nei casi più gravi si ha un coinvolgimento sistemico che può portare a morte il soggetto.

La presenza di FHV-1 a livello corneale e/o ematico è stata evidenziata in gatti che presentavano sequestri corneali o cheratiti eosinofiliche (Bistner SI *et al.*, 1971; Nasisse MP *et al.*, 1998; Andrew SE, 2001; Allgoewer I, 2001; Westermeyer HD, 2009). Il DNA virale è stato riscontrato anche nell'umor acqueo di gatti affetti da uveite e questo potrebbe suggerire un ruolo del virus nel provocare l'infiammazione dell'uvea (Maggs DJ *et al.*, 1999).

L'infezione da FHV-1 può manifestarsi con lesioni localizzate e/o sistemiche, con decorso asintomatico e/o fatale. La prognosi dipende dall'età e dallo stato immunitario dell'ospite. I gattini, che vengono a contatto per la prima volta con l'infezione sviluppano, prevalentemente, una malattia acuta. Nei gatti adulti, a causa della riattivazione dell'infezione latente, si possono avere recidive (Gaskel R, 2007).

Tabella 3: Manifestazioni cliniche riscontrabili in corso di infezione acuta e cronica da FHV-1 nel gatto

Tipo di infezione	Principali segni clinici
Decorso acuto (caratterizzato dall'effetto citolitico del virus)	Congiuntiviti, ulcere corneali, ulcere corneali dendritiche, scolo nasale, starnuti. Lesioni erosivo ulcerative localizzate soprattutto a muso, aree periorbitali e dorso del naso. Alcuni gatti infetti presentano lesioni simmetriche facciali che possono mimare malattie immunomediate. Possibile viremia con segni clinici sistemici che può portare a morte.
Decorso cronico (caratterizzato dall'effetto immunomediato)	Edema della cornea, sequestri corneali, cheratiti eosinofiliche, uveite, cecità Sinusiti croniche caratterizzate da starnuti e scoli nasali

1.4 Lesioni macroscopiche cutanee dell'infezione da FHV-1

Le lesioni cutanee causate da FHV-1 nel gatto sono poco frequenti (Johnson RP, 1971; Flecknell PA, 1979; Junge RE, 1991; Hargis AM *et al.*, 1999; Gross TL *et al.*, 2005; Holland JL *et al.*, 2006; Gaskel R, 2007; Westermeyer HD *et al.*, 2009). Sono state descritte su muso, aree periorbitali e dorso del naso (Flecknell PA *et al.*, 1979; Hargis AM, 1999; Gross, 2005).

Alcuni gatti presentano lesioni simmetriche facciali che possono mimare malattie di origine immunomediata (Gross TL *et al.*, 2005).

Le lesioni cutanee indotte da FHV-1 hanno carattere erosivo, ulcerativo, crostoso, talora vescicolare e si accompagnano ad eritema ed essudazione (Hargis AM, 1999; Gross TL *et al.*, 2005). Può essere riscontrata una linfadenopatia regionale collegata probabilmente a infezione secondaria (Gross TL *et al.*, 2005; Johnson RP, 1971).

Lesioni cutanee riconducibili alla presenza di FHV-1 sono state osservate solo nei ghepardi (Gaskel R, 2007) dove è stata descritta una dermatite ulcerativa del naso associata a stomatite e caratterizzata istopatologicamente da un infiltrato eosinofilo e dal riscontro dei corpi inclusi caratteristici.

L'eterogeneità delle lesioni macroscopiche indotte da FHV-1 porta a formulare molte diagnosi differenziali eziologicamente e patogeneticamente diverse tra loro. Le diagnosi differenziali (Tabella 4) includono l'ipersensibilità alla puntura e/o al morso di insetto, la reazione avversa al cibo, le malattie correlate al complesso del granuloma eosinofilo (CGE), le infezioni batteriche, altre dermatiti virali, il pemfigo foliaceo e alcune forme di neoplasia come il carcinoma squamocellulare (Gross TL *et al.*, 2005).

Tabella 4: elenco delle principali diagnosi differenziali in corso di lesioni erosive ulcerative a carico della testa nella specie felina

Eziologia	Diagnosi Differenziali
Allergiche	Allergia alimentare Dermatite atopica Dermatite allergica al morso della pulce Ipersensibilità alla puntura degli insetti Allergia da contatto Placca eosinofilica idiopatica Ipersensibilità a parassiti intestinali Sindrome ipereosinofilica
Fungine	Dermatofiti Malassezia spp. Criptococcosi Altre micosi sottocutanee e/o sistemiche
Ectoparassiti	Cheiletiellosi Trombiculiasi Otodectosi Pediculosi Rogna notoedrica Rogna demodettica
Reazioni da farmaco	Sulfamidici
Dermatiti autoimmuni	Lupus eritematoso sistemico Lupus eritematoso discoide Complesso pemfigo
Neoplastiche	Carcinoma squamocellulare
Virali	Poxvirus Herpesvirus
Altre	Piodermiti Dirty face Dermatite solare Dermatosi ulcerativa Micobatteriosi

1.5 Diagnosi

I gatti che presentano un'infezione da FHV-1 acuta (fase primaria), senza sintomatologia cutanea, diffondono tramite i loro secreti quantità di virus tali da rendere la diagnosi clinica relativamente semplice (Andrew SE, 2001-2008). I segni clinici in questa fase sono spesso caratteristici e autolimitanti. Al contrario, nel corso di infezioni croniche o riattivazioni di FHV-1, l'ambiguità delle manifestazioni cliniche rende la diagnosi eziologica più complessa. In questi casi, la bassa attività replicativa del virus influisce sulla scelta degli esami complementari (Maggs DJ, 2005). Attualmente le metodiche diagnostiche a disposizione sono molte e la scelta del tipo di esame va effettuata in base alla sintomatologia (concomitante presenza di sintomi respiratori, cutanei e oculari) e al tipo di materiale che si intende campionare (croste, ulcere, erosioni, vescicole, essudato, sangue).

1.5.1 Metodiche diagnostiche per la ricerca di FHV-1 nella cute di gatti con lesioni dermatologiche

1.5.1.a Reazione a catena della polimerasi (*Polymerase chain reaction*, PCR)

La PCR consente d'identificare alcune sequenze virali, tramite primer specifici, permettendo il riconoscimento del virus nel campione in esame, con l'amplificazione di una specifica sequenza nucleotidica del DNA. Nei laboratori di diagnostica per l'identificazione di FHV-1 si utilizzano: PCR convenzionale, nested-PCR e real-time PCR (Maggs DJ *et al.*, 1999; Hara M *et al.*, 1996; Marsilio F *et al.*, 2004; Sykes JE *et al.*, 2001). I primer specifici amplificano una regione del gene della timidina chinasi che rappresenta uno dei target preferenziali per la diagnosi di herpesvirus tramite PCR (Westermeyer HD *et al.*, 2009; Hara M *et al.*, 1996; Reubel Gh *et al.*, 1993). La diagnosi molecolare sembra più sensibile dell'isolamento virale o dell'immunofluorescenza indiretta (Weigler BJ *et al.*, 1997). La PCR è, attualmente, considerata il metodo di elezione per valutare la presenza di FHV-1 nelle biopsie cutanee, oltre che in altri campioni biologici (Holland JL *et al.*, 2006; Reubel GH *et al.*, 1993; Burgesser KM *et al.*, 1999; Suchy A *et al.*, 2000).

L'uso della PCR in gatti che presentano dermatiti ulcerative facciali dove si sospetta un'eziologia virale ha però diversi limiti.

Prima di tutto, l'integrazione del DNA virale con il DNA cellulare dell'ospite non permette di differenziare tra infezione attiva e stato di portatore (Gaskel R, 2007; Holland JL *et al.*, 2006). Un altro limite nell'impiego della PCR è che la sensibilità varia a seconda del tipo di PCR impiegata, dal numero di cicli, dal tipo di primer, dal tampone, dalla temperatura e dall'eventuale contaminazione. In generale, con l'aumentare della sensibilità (capacità di rilevare un basso numero di coppie) aumenta anche la possibilità di ottenere falsi positivi (Gaskel R, 2007; Veir JK *et al.*, 2002). La somministrazione di vaccino attenuato crea uno stato di latenza virale nel trigemino, con possibile riattivazione dell'infezione rilevabile con PCR (Maggs DJ, 2005).

L'alta sensibilità della PCR è quindi anche il suo limite. Un risultato positivo a FHV-1 va sempre interpretato con cautela e correlato al quadro clinico (Westermeyer HD *et al.*, 2009).

1.5.1.b Isolamento virale

L'isolamento del virus si esegue utilizzando colture cellulari da linee cellulari feline in cui è possibile rilevare l'effetto citopatico causato dalla replicazione di FHV-1. L'isolamento virale può essere utile in corso di infezione acuta, visto l'elevata capacità replicativa virale. Nelle infezioni croniche tale metodica risulta difficoltosa ed è considerata meno sensibile della PCR (Maggs DJ *et al.*, 2005; Burgesser KM *et al.*, 1999).

1.5.1.c Tecniche immunologiche

L'identificazione di FHV-1 in campioni cutanei può avvenire tramite tecniche immunodiagnostiche (come immunofluorescenza, immunoistochimica e ELISA) (Suchy A *et al.*, 2000) che utilizzano l'anticorpo virus specifico coniugato con cromogeno. L'immunoistochimica è considerata un metodo diagnostico estremamente sensibile perchè a un singolo punto di legame tra antigene e anticorpo corrispondono numerose molecole di enzima in grado di fornire il segnale cromatico. L'immunoistochimica permette l'identificazione di proteine specifiche di FHV-1 in biopsie cutanee (Burgesser KM *et al.*, 1999).

La tecnica ELISA si basa sul presupposto che un antigene ed un anticorpo si possono legare ad uno stesso enzima (Dawson DA *et al.*, 1998). La tecnica ELISA viene utilizzata principalmente per rilevare gli anticorpi da FHV-1 nel siero, nell'umor

acquoso e nel liquido cerebrospinale. Il limite di utilizzo della tecnica ELISA per la ricerca di FHV-1 è che la sieroprevalenza è normalmente molto alta per l'infezione naturale e la vaccinazione, quindi la presenza di anticorpi specifici non può essere correlata alla malattia e/o a un'infezione attiva (Maggs DJ *et al.*, 2005; Dawson DA *et al.*, 1998).

1.5.1.d Esame citologico

Ad oggi non sono stati condotti degli studi per valutare l'attendibilità dell'esame citologico per la ricerca di FHV-1 da lesioni cutanee con diagnosi istopatologica certa (presenza di corpi inclusi) a differenza di quanto riportato per lesioni oculari (ad esempio in corso di cheratite herpetica (Bistner SI *et al.*, 2001; Nasisse MP *et al.*, 1993; Volopich S *et al.*, 2005).

1.5.1.e Esame istopatologico cutaneo

Microscopicamente, in tutti i tessuti, le lesioni causate da herpesvirus sono caratterizzate da necrosi focale e dalla presenza di corpi inclusi intranucleari purtroppo non sempre identificabili. Il quadro istopatologico delle dermatiti ulcerative del gatto, tipiche dell'infezione herpetica, è caratterizzato da grave necrosi e ulcere a carico dell'epidermide, con estensione del processo necrotico al derma (Gross TL *et al.*, 2005) (Figura 3). Generalmente è presente un'abbondante essudazione con formazione di estese croste superficiali. L'epidermide confinante alle ulcere è acantotica. Possono essere presenti una grave spongiosi, una degenerazione balloniforme e, occasionalmente, delle vescicole superficiali. Il processo di necrosi e di spongiosi si può estendere fino all'interno della parte superficiale dei follicoli, spesso all'istmo. L'epitelio che riveste l'infundibolo dei follicoli piliferi è iperplastico e gli eosinofili frequentemente migrano e degranulano al suo interno.

I corpi inclusi intranucleari, cosiddetti corpi metallici o amfifilici (Figura 4), sono difficili da identificare e non sempre riscontrabili. Quando sono presenti si evidenziano soprattutto nell'epitelio intatto in prossimità dei foci di necrosi e nell'epitelio superficiale dei follicoli piliferi. Nelle aree di necrosi profonda i corpi inclusi si possono rilevare più agevolmente nelle cellule delle ghiandole sebacee (Gross TL *et al.*, 2005) e si presentano come un'area omogenea "metallica" che sostituisce il normale disegno cromatinico ed induce marginazione della cromatina. Il derma è intensamente e diffusamente infiammato, con prevalente popolazione di

granulociti eosinofili e di neutrofili. Nella maggior parte dei casi l'estesa distruzione tissutale, causata dall'infezione virale, e la presenza di un infiltrato infiammatorio possono ostacolare la diagnosi istologica, non permettendo la visualizzazione dei corpi inclusi (Gross TL *et al.*, 2005).

La lista delle diagnosi differenziali istologiche comprende tutte quelle malattie eosinofiliache (lesioni del complesso eosinofilo felino e ipersensibilità alla puntura degli insetti) che possono dare quadri clinici ed istopatologici sovrapponibili (Gross TL *et al.*, 2005). Nella placca eosinofila istologicamente si riscontrano spongiosi e mucinosi, senza coinvolgimento dell'epidermide e dei follicoli superficiali. Nell'ulcera indolente spesso si rileva intensa degranulazione degli eosinofili con gradi diversi di ulcerazione e necrosi sottostante. L'ipersensibilità alla puntura degli insetti è caratterizzata da papule, croste, alopecia, erosioni, ulcerazione ed essudato. I reperti istopatologici sono dati da acantosi, spongiosi, erosioni, ulcerazione ed essudazione di entità variabile con infiammazione eosinofila del derma che può dare quadri di "figure a fiamma". Il quadro istopatologico della dermatite herpetica e dell'ipersensibilità alla puntura degli insetti non sono distinguibili se non si identificano i corpi inclusi intranucleari (Gross TL *et al.*, 2005).

Le diagnosi differenziali, per quanto riguarda le infezioni herpetiche con infiltrato neutrofilico, comprendono le infezioni batteriche croniche (anche su base traumatica) e le lesioni secondarie a cowpoxvirus. In questi casi il riscontro dei corpi inclusi di tipo A (intracitoplasmatici, eosinofili, di dimensione variabile e spesso multipli) caratteristici del cowpoxvirus permette di formulare una diagnosi morfologica (Gross TL *et al.*, 2005).

A seguito delle numerose diagnosi differenziali possibili in caso di sospetta lesione cutanea da FHV-1, la letteratura corrente consiglia campionamenti biotici multipli, sia da aree ulcerate, sia da cute integra (Gross TL *et al.*, 2005).

L'esame istopatologico permette una diagnosi eziologica certa solo con il riscontro dei corpi inclusi intranucleari caratteristici di FHV-1. Nel caso questi non siano evidenziabili ed il sospetto clinico permanga è necessario ricorrere ad altre tecniche quali l'immunoistochimica per l'identificazione dell'espressione proteica (Gross TL *et al.*, 2005) e/o la PCR per la ricerca del DNA virale.

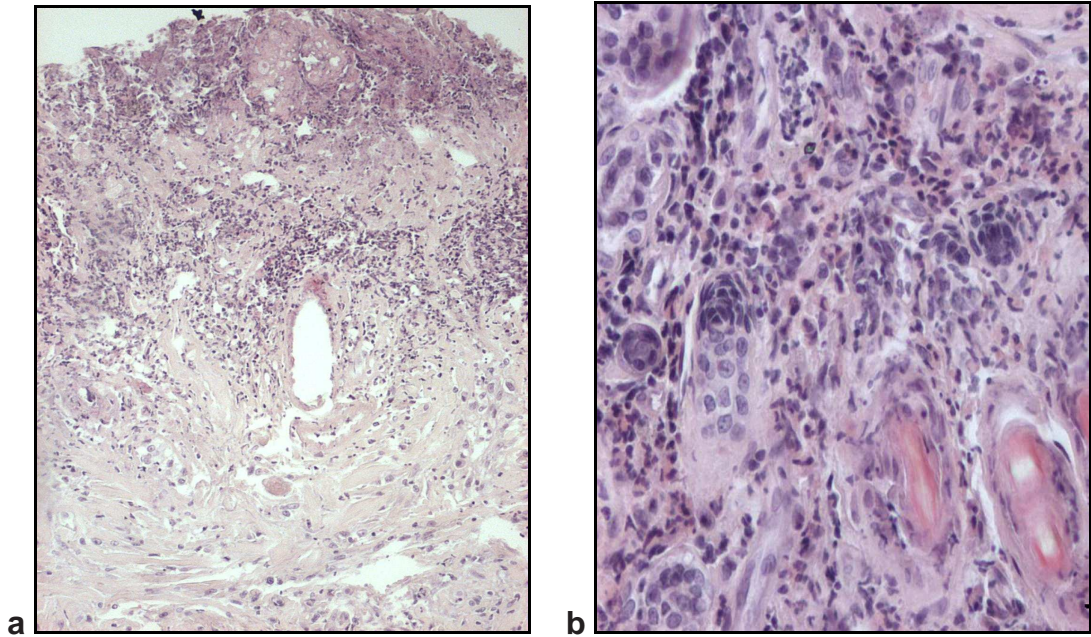


Figura 3 a e b: Quadro istopatologico caratterizzato da necrosi focale/multifocale a carico dell'epidermide con estensione al follicolo. **Figura 3 a:** grave degenerazione del collagene. **Figura 3 b:** presenza di un infiltrato eosinofilo dermico in un caso di FHV-1.

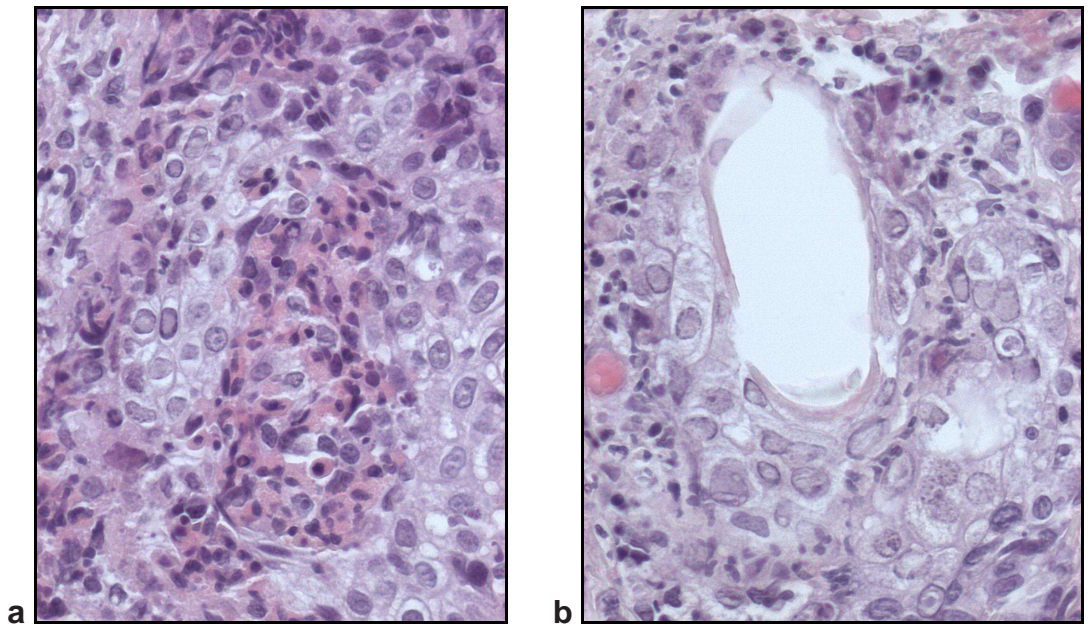


Figura 4 a: presenza di aggregati di eosinofili e di un minor numero di granulociti neutrofili da perivascolari a diffusi. **Figura 4 b:** caratteristici corpi inclusi intranucleari con aspetto omogeneo "metallico" associato a marginazione della cromatina

1.6 Obiettivi dello studio

Lo scopo di questo studio retrospettivo è stato quello di valutare con IHC e PCR l'eventuale presenza di FHV-1 in biopsie cutanee di gatti. Le biopsie non dovevano evidenziare la presenza di corpi inclusi intranucleari caratteristici da FHV-1 ma essere compatibili con il quadro istopatologico classicamente descritto in associazione ad infezione da FHV-1.

1.7 Materiali e metodi

In questo studio retrospettivo sono state selezionate 64 biopsie cutanee provenienti da 62 gatti di proprietà con un quadro istopatologico compatibile con malattie correlabili al CGE e dermatiti ulcerative, in assenza di corpi inclusi da FHV-1. I criteri d'inclusione erano: biopsie cutanee provenienti da gatti con una precedente diagnosi istopatologica di malattia correlabile al complesso del granuloma eosinofilo, ipersensibilità alla puntura degli insetti o dermatite ulcerativa.

L'unico criterio di esclusione è stato il riscontro, nel corso dell'esame istopatologico di corpi inclusi. Dalle schede di accompagnamento sono stati raccolti dati riguardanti il segnalamento, l'anamnesi clinica e farmacologica, l'aspetto e la localizzazione delle lesioni macroscopiche e lo stato vaccinale.

Come gruppo di controllo positivo sono state utilizzate biopsie cutanee di gatti in cui si evidenziava la presenza di corpi inclusi caratteristici da FHV-1.

1.7.1 Valutazione istopatologica

Tutte le sezioni originali colorate con ematossilina-eosina sono state riesaminate per escludere con certezza la presenza di corpi inclusi eventualmente non evidenziati nel corso del primo esame istopatologico. Delle nuove sezioni (5-6 micron) sono state ottenute dai blocchetti in paraffina originali e colorate con ematossilina-eosina. In aggiunta le sezioni sono state sottoposte a colorazioni speciali: PAS, Ziehl-Neelsen, Gram per identificare eventuali agenti eziologici differenti.

1.7.2 Tecnica di biologia molecolare classica (PCR) seguita per l'identificazione di FHV-1

La ricerca del DNA virale è stata effettuata utilizzando 4 sezioni di 25 mm dalle biopsie. Per deparaffinare i tessuti le sezioni sono state immerse in una soluzione di 200 ml di Tris 10 mM e 200 ml di olio minerale, e posizionate in un bagno a 60°C fino allo scioglimento della paraffina. Il campione è stato centrifugato per 1-2' a 13000 rpm in modo che il frammento di tessuto migrasse nella fase acquosa e trasferito su un pezzetto di parafilm (Pechiney®-Plastic Packaging, Chicago USA) opportunamente inclinato di 45° per fare aderire i residui oleosi contenenti la paraffina disciolta al parafilm e separarli dalla fase acquosa ove si trovava il frammento di tessuto.

L'estrazione del DNA è stata effettuata con una metodica standard di digestione con proteinasi K e SDS a 55°C per due ore circa. La soluzione risultante è stata estratta una volta con un uguale volume di fenolo (Fluka®): cloroformio (Fluka®): alcool isoamilico (Fluka®) 25:24:1 e una volta con un uguale volume di cloroformio. Dopo aver aggiunto alla fase acquosa recuperata ammonio acetato fino a circa 2M e due volumi di etanolo assoluto, il DNA è stato precipitato mediante centrifugazione a 13000 rpm per 30'. Scartato il surnatante il 'pellet' di DNA è stato lavato con etanolo al 70%, asciugato all'aria per 15-30', e dissolto in 100 ml di tampone TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8).

Le sequenze dei primer utilizzati sono state:

- FHV-F 5'TGTCCGCATTTACATAGATGG 3'
- FHV-R 5'GGGGTGTTCCCTCACATACAA 3'

La miscela di reazione era così composta: 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 0.1% gelatina (fornite nel tampone di reazione come concentrato 10X); 2 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 0.2 mM di ciascun primer, 0.035 unità/ml Taq polimerasi (Sigma D2812), 0.2 M trealoso, 2 ml di DNA in un volume di reazione di 25 ml. Il profilo di PCR era: denaturazione iniziale di 1' a 94°C, seguito da 11 cicli con: 95°C, 45" (denaturazione); 62°C, 45" diminuendo la temperatura di 1°C per ciclo (touchdown annealing); 72°C, 45" (estensione); nei successivi 30 cicli si è mantenuta costante la temperatura di annealing: 95°C, 30"; 51°C, 30"; 72° C, 30"; al termine si è effettuata un'estensione finale di 5' a 72°C. Gli amplificati sono stati poi caratterizzati mediante elettroforesi su gel di agaroso al 2% in tampone TAE 0.5X (Tris/Acetato/EDTA) per 1

ora a 120 V e identificati in base alle dimensioni confrontandoli con uno standard di peso molecolare (PCR 100 bp Low Ladder, Sigma P1473[®] USA).

La tecnica di PCR per l'identificazione del DNA virale da FHV-1 è stata ripetuta 3 volte per ridurre eventuali errori. Come controllo negativo si è utilizzata acqua distillata sterile.

1.7.3 Tecnica di immunoistochimica per l'identificazione di FHV-1

Per valutare l'espressione antigenica virale tramite immunoistochimica sono state allestite sezioni di 5 µm da tutte le biopsie selezionate. È stato utilizzato un anticorpo monoclonale prodotto in topo anti-FHV-1 (Custom Monoclonals International[®], diluizione 1:150, Sacramento, CA, U.S.A). L'indagine immunoistochimica è stata realizzata partendo dalle inclusioni in paraffina preventivamente utilizzate per l'esame istologico. Sezioni di tessuto di 5 µm di spessore sono state montate su vetrini polilisinati (Superfrost Plus Slides-Menzel Glasser[®], Brasnschweig-D). le sezioni sono atate sparaffinate in 2 passaggi in xilolo di 15 minuti ciascuno e reidratate in alcool a gradiente discendente (Alcool assoluto 1 5'; Alcool assoluto 2 5'; Alcool 95° 2'; Alcool 70° 2'). Sono state lavate con soluzione tampone (Tampone Tris a pH 7 per 3 minuti). È stato effettuato uno smascheramento antigenico con pepsina seguito da blocking con siero normale di cavallo 1:50 per 30 minuti. La soluzione di anticorpo monoclonale, diluita in tampone 1:150, è stata applicata alle biopsie così allestite e incubate overnight a 18°C. L'eccesso di anticorpo è stato eliminato con risciacqui in tampone TRIS (pH 7.6; 3 cambi da 10') e le sezioni sono state successivamente incubate con complesso ABC (sistema biotina-avidina-perossidasi per 30'). Tutte le sezioni sono state sottoposte a 3 cicli di lavaggi (Tris, di 10') e sviluppate con 3-amino-9-ethylcarbazolo (AEC per 15'). Le sezioni sono state quindi lavate con acqua corrente (4') e contro-colorate con emallume di Mayer (1'), disidratate in alcool, immerse in xilolo e montate con balsamo sintetico (Merk[®]).

I controlli negativi provenivano da dermatiti ulcerative di origine canina.

I controlli positivi derivavano da casi di dermatite erpetica felina accertati dalla presenza di corpi inclusi.

L'immunoistochimica è stata ripetuta due volte su tutte le sezioni e sono state fatte prove di diluizione 1:500 e 1:250 sui controlli positivi e negativi.

1.8 Risultati

Sono state esaminate complessivamente 64 biopsie cutanee.

Le sezioni provenivano da 55 gatti comuni europei, 6 persiani, 1 certosino e 1 bengala. Nel campione selezionato erano presenti 26 maschi, 14 maschi castrati, 18 femmine e 6 femmine sterilizzate. Non è stato possibile conoscere lo stato di salute dei soggetti e la presenza di eventuali malattie sistemiche sottostanti se non in 3 casi (1 soggetto FIV positivo, 1 gatto FeLV positivo e 1 affetto da diabete).

Dall'analisi delle schede anamnestiche di accompagnamento tutti i soggetti risultavano regolarmente vaccinati.

L'età dei soggetti risultati positivi era compresa tra i 9 mesi e i 9 anni, di questi 3 erano maschi, 5 maschi castrati e 4 femmine intere.

Tutti i soggetti risultati positivi erano gatti comuni europei tranne 1 di razza bengala. 40 biopsie cutanee provenivano dalla regione testa/collo/cavo orale, 8 da arti e polpastrelli e per 16 campioni non era specificata la provenienza. Solo da un soggetto sono pervenute tre biopsie, che sono state considerate separatamente mentre da tutti gli altri soggetti si è considerata l'unica biopsia presente.

La tecnica di biologia molecolare ha evidenziato 12 campioni positivi: 10 provenienti da gatti con malattie correlabili al CGE e 2 da gatti con dermatite ulcerativa. Tutti i campioni positivi provenivano dalla regione testa, collo e cavo orale (Figura 5). L'esame con tecnica immunoistochimica, di tutte le sezioni, ha evidenziato due casi debolmente positivi che corrispondevano a due campioni precedentemente risultati positivi alla PCR, tutte le altre 62 sezioni analizzate sono risultate negative (Figura 6)

I risultati della PCR e dell'IHC sono stati comparati utilizzando l'IHC come gold standard. La sensibilità è risultata pari al 100%, la specificità dell'83.87%, il valore positivo predittivo 16.6, il valore predittivo negativo 100 e la prevalenza pari a 3.12.

Tutti i risultati riguardanti il segnalamento, la diagnosi istopatologica, gli esiti della PCR e dell'immunoistochimica sono riassunti in tabella 5.

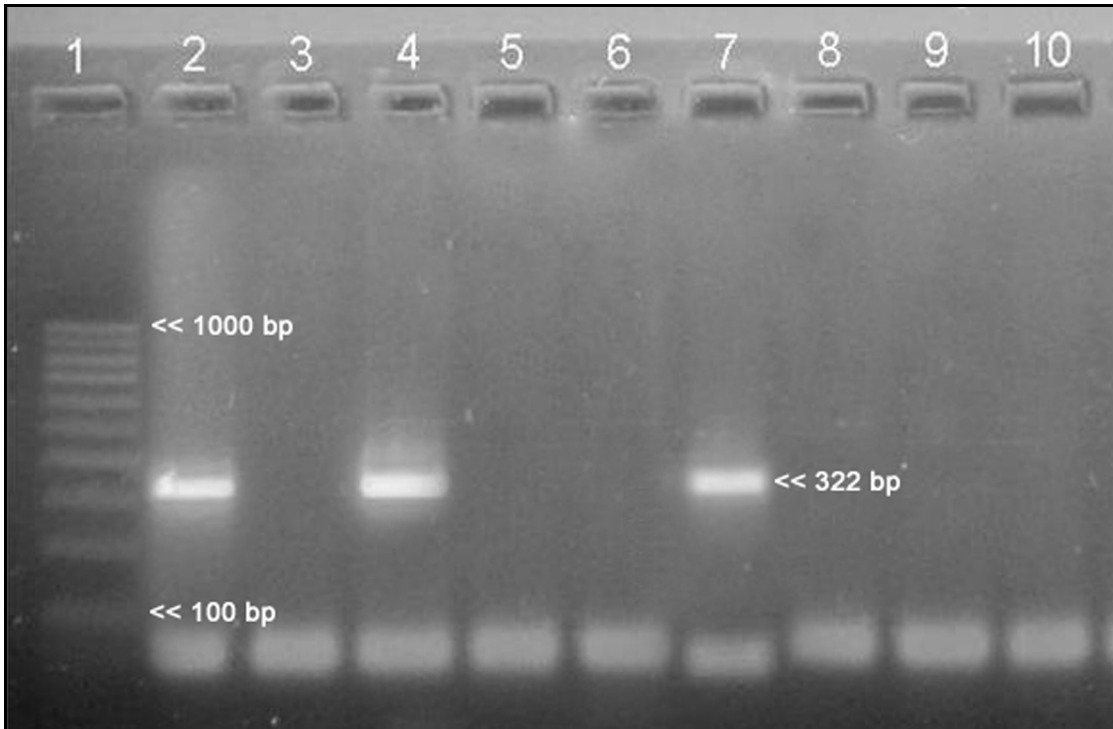


Figura 5: PCR: elettroforesi su gel di agaroso per la ricerca di FHV-1. Linea 1, 100bp ladder; linea 2, controllo positivo; linee 3-5-6-8-9, campioni negativi; linee 4 e 7, campioni positivi; linea 10, controllo negativo.

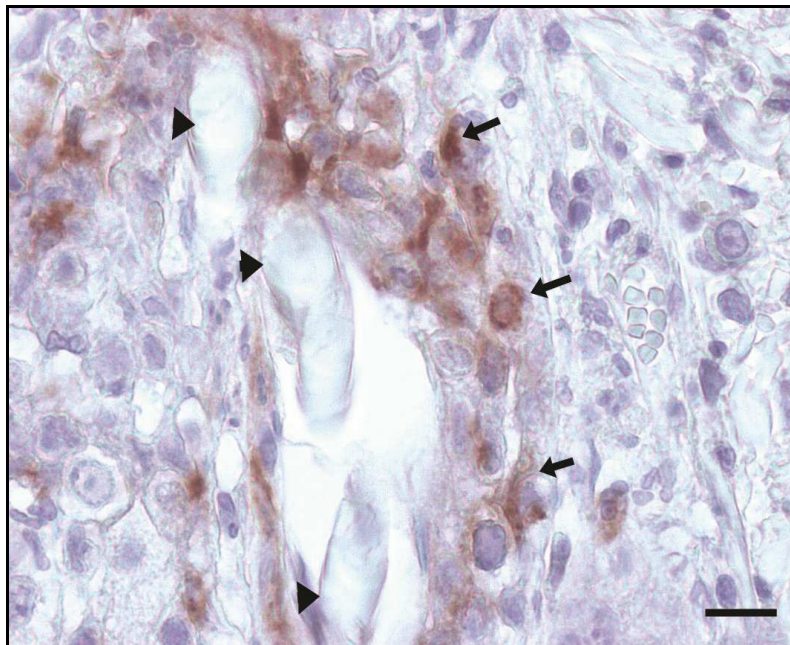


Figura 6: IHC: follicolo pilifero con frammenti di pelo. Positività variabile citoplasmatica a carico dei cheratinociti del follicolo pilifero (frecce) (IHC anti-FHV-1, cromogeno carbazolo, bara= 20 micron)

Tabella 5a: Segnalamento, diagnosi istopatologica, esiti PCR e IHC delle 64 biopsie incluse nello studio

#	Razza	Sesso	Età	Regione biopsia	Diagnosi istopatologica	Corpi inclusi	PCR	IHC
1.	CE	MC	11		CGE	-	-	-
2.	CE	F	7	Zampa	CGE /placca eosinofilica	-	-	-
3.	CE	M	7	Muso	CGE	-	-	-
4.	CE	FS	2		CGE /placca eosinofilica	-	-	--
5.	CE	FS	5	Testa /pericolare	CGE	-	-	-
6.	CE	M	3	Collo	CGE	-	-	-
7.	CE	F	9	Muso	CGE	-	-	-
8.	CE	F	9	Muso	CGE	-	-	-
9.	CE	FS	10	Testa naso	CGE	-	-	-
10.	CE	FS	6	Testa	CGE	-	-	-
11.	CE	M	1.5		CGE	-	-	-
12.	CE	M	2		CGE	-	-	-
13.	CE	M	13	Testa	CGE/placca eosinofilica	-	-	-
14.	CE	M	2	Pericolare/collo	CGE/placca eosinofilica	-	-	-
15.	CE	M	9		CGE/placca eosinofilica	-	-	-
16.	CE	F	13	Muso	CGE	-	-	-
17.	CE	M	14	Naso dorsale	CGE	-	-	-
18.	CE	F	6	Testa	CGE/placca eosinofilica	-	-	-
19.	CE	M	4	Testa	CGE	-	-	-
20.	CE	M			CGE	-	-	-
21.	Persiano	M	11	Muso	CGE	-	-	-
22.	Persiano	F	13		CGE	-	-	-
23.	CE	MC	1.5	Collo	CGE	-	-	-
24.	CE	M	7	Polpastrello	CGE	-	-	-
25.	CE	M	5	Muso	CGE/placca eosinofilica	-	-	-
26.	CE	MC	3	Muso /Labbro	CGE	-	-	-
27.	CE	MC	13	Zampa	CGE	-	-	--
28.	CE	MC		Testa	CGE	-	-	-
29.	Certosino	M	1	Testa	CGE/placca eosinofilica	-	-	-
30.	Persiano	FS	14		CGE	-	-	-
31.	CE	F	1	Zampa	CGE	-	-	-
32.	CE	MC	11m	Zampa	CGE	-	-	-
33.	CE	M	3	Collo	CGE	-	-	-

Tabella 5b: Segnalamento, diagnosi istopatologica, esiti PCR e IHC delle 64 biopsie incluse nello studio

#	Razza	Sesso	Età	Regione biopsia	Diagnosi istopatologica	Corpi inclusi	PCR	IHC
34.	Persiano	M	6	Collo	CGE/placca eosinofilica	-	-	-
35.	CE	M	8m	Muso /Labbro	CGE	-	-	-
36.	CE	M	2	Testa	CGE	-	+	+
37.	CE	M	3	Testa	CGE	-	+	-
38.	CE	M	9	Testa/Collo	CGE	-	+	+
39.	CE	F	5	Collo	CGE	-	-	-
40.	CE	F	9m	Testa	CGE	-	+	-
41.	CE	FS	4	Zampa	CGE	-	-	-
42.	CE	MC	3	Collo	CGE	-	+	-
43.	Bengala	MC	2	Testa	Dermatite ulcerativa/CGE	-	+	-
44.	CE	F	1	Muso	CGE	-	-	-
45.	CE	MC	3	Naso	Ipersensibilità insetti	-	-	-
46.	CE	MC	2	Collo	CGE	-	+	-
47.	CE	F	9	Testa/Collo	Dermatite ulcerativa	-	+	-
48.	Persiano	M	12	Naso	Ipersensibilità insetti	-	-	-
49.	CE	M	1.5		CGE/placca eosinofilica	-	-	-
50.	CE	MC	1	Muso	CGE	-	+	-
51.	CE	F	8	Muso	CGE	-	-	-
52.	CE	MC	2	Collo	CGE	-	+	-
53.	CE	M			CGE/placca eosinofilica	-	-	-
54.	CE	M	12	Muso	CGE/placca eosinofilica	-	-	-
55.	CE	F	14	Zampa	CGE	-	-	-
56.	CE	F	6		CGE	-	-	-
57.	CE	MC	2	Zampa	CGE	-	-	-
58.	CE	F	1	Testa	CGE	-	+	-
59.	CE	F	1	Testa	CGE	-	+	-
60.	Persiano	M			CGE/placca eosinofilica	-	-	-
61.	CE	F	12		CGE/placca eosinofilica	-	-	-
62.	CE	M	1, 6M		CGE	-	-	-
63.						-	-	-
64						-	-	-

CE: comune europeo; M: maschio; MC: maschio castrato; F: femmina; FS: femmina sterilizzata; CGE: malattie correlabili al complesso del granuloma eosinofilico

1.9 Discussione

L'immunoistochimica utilizzata in questo studio ha permesso d'identificare una proteina di FHV-1 derivante dall'envelope nucleare indicativa dell'avvenuta trascrizione dei geni e della traduzione dell'mRNA. Il riconoscimento delle proteine virali ha dimostrato l'implicazione di FHV-1 nella patogenesi delle lesioni cutanee macroscopiche. La dimostrazione della presenza dell'antigene virale è essenziale in alcune malattie virali come le dermatiti erosivo-ulcerative associate a FHV-1.

In questo studio retrospettivo sono state analizzate, tramite IHC e PCR, 64 biopsie cutanee di dermatiti ulcerative con quadro clinico e istologico compatibile con dermatiti da FHV-1 in assenza di corpi inclusi intranucleari caratteristici. I risultati di questa analisi hanno evidenziato solo due casi che, in assenza dei corpi inclusi caratteristici, sono risultati positivi sia alla PCR che all'IHC.

Queste due biopsie corrispondevano a gatti comuni europei, maschi che macroscopicamente presentavano delle lesioni erosive e crostose a carico della testa e del collo, inizialmente entrambe le biopsie erano state diagnosticate come quadri riconducibili a malattie del complesso del granuloma eosinofilo (CGE).

Nei due casi risultati positivi la riattivazione della trascrizione virale da FHV-1 può essere subentrata in associazione a CGE oppure la riattivazione di FHV-1 può aver indotto una reazione cronica tessutale con un'alterazione della risposta del sistema immunitario che si è manifestata con un quadro lesionale micro e macroscopico riconducibile a CGE. Questa ipotesi è riscontrabile anche da quanto riportato in letteratura riguardo a FHV-1 nei gatti con malattie cutanee croniche dovute ad infiammazione e/o allergia (Lee *et al.*, 2010; Holland JL *et al.*, 2006).

Nel nostro studio tutte le biopsie presentavano dei quadri istopatologici sovrapponibili in cui si evidenziava ulcerazione a carico dell'epidermide e del derma e un'infiammazione eosinofila e occasionalmente neutrofila da perivascolare a diffusa.

La diagnosi di FHV-1, in assenza dei corpi inclusi intranucleari caratteristici e di reperti clinici significativi richiede l'utilizzo di altre tecniche diagnostiche. La PCR è considerata una delle tecniche migliori per la diagnosi di dermatite da FHV-1 da tessuti conservati in paraffina (Holland JL *et al.*, 2006; Weigler BJ *et al.*, 1997) per la sua alta sensibilità, riproducibilità e rapidità (Weigler BJ *et al.*, 1997).

Nelle biopsie da noi analizzate abbiamo osservato un alto numero di PCR-positive.

Per l'identificazione molecolare di FHV-1 sono stati utilizzati primers specifici che amplificavano una regione di 322 nt del gene della timidina chinasi (GenBank acc. n° M26660). Questo gene è uno dei target preferenziali utilizzati nella diagnosi tramite PCR di FHV-1 (Reubel GH *et al.*, 1993; Hara *et al.*, 1996; Nasisse MP *et al.*, 1998). (Weigler BJ *et al.*, 1997; Hussein IT *et al.*, 2008).

La PCR classica, tramite primer specifici, consente d'identificare il virus nel campione in esame mediante l'amplificazione di una sequenza nucleotidica del DNA virale ed è attualmente considerata il metodo di elezione per valutare la presenza di FHV-1 nelle biopsie cutanee del gatto (Haid C *et al.*, 2007; Gutzwiller ME *et al.*, 2007; Hussein IT *et al.*, 2008). I nostril risultati sembrano confermare che la PCR classica possa sovrastimare il reale ruolo di FHV-1 nelle dermatiti ulcerative. Questa conclusione è basata sul fatto che la PCR classica, essendo molto sensibile ed amplificando un ridotto numero di coppie virali di DNA, identifica una sequenza nucleare (Hussein IT *et al.*, 2008) che è inserita nella cellula ospite durante un'infezione naturale ma anche nel corso della vaccinazione (Parzefall B *et al.*, 2010; Sussmann MD *et al.*, 1997).

Molti ceppi di herpes virus epiteliotropo sono caratterizzati dallo sviluppo di infezioni latenti (Khanna KM *et al.*, 2004; Lang A *et al.*, 2009), se questo è vero anche per FHV-1 una PCR positiva può confermare un precedente contatto con FHV-1 (infezione, vaccinazione) (Parzefall B *et al.*, 2010) ma non può dimostrare un ruolo diretto di FHV-1 nell'eziologia della lesione cutanea osservata, soprattutto in biopsie cutanee ottenute da regioni del muso dove il virus si localizza normalmente durante il suo periodo di latenza (Burgesser KM *et al.*, 1999; Suchy A *et al.*, 2000).

In Italia la vaccinazione nei confronti di FHV-1 viene effettuata, nella quasi totalità dei vaccini in commercio, con ceppi virali attenuati e non morti o modificati. L'assenza di marker che possano discriminare tra ceppi naturali e vaccinali per FHV-1 non permette, a nostro avviso, di utilizzare la PCR come metodo diagnostico discriminativo perché, da quanto riportato in letteratura, sembra che una ridotta ma persistente trascrizione di proteine virali di FHV-1 permanga dopo l'intervento vaccinale (Parzefall B *et al.*, 2010; Sussmann MD *et al.*, 1997).

L'immunoistochimica è considerata un metodo diagnostico sensibile che permette l'identificazione di proteine specifiche di FHV-1 in biopsie cutanee. Il riconoscimento delle proteine virali permette la dimostrazione di antigeni virali ed indica l'avvenuta trascrizione dei geni e la traduzione dell'mRNA. L'immunoistochimica è quindi in

grado di evidenziare un'elevata quantità di proteine virali tale da poter essere ritenuta indicativa di un'infezione in corso e non di un'infezione latente (in cui vengono tradotte piccole quantità di proteine virali).

La sensibilità, la specificità e il valore predittivo dell'IHC nelle biopsie da noi analizzate sono risultate molto alte questo conferma che la diagnosi di FHV-1 non può essere correlata esclusivamente a un esito PCR-positivo.

In pratica la PCR può essere utilizzata come primo test di screening per escludere la presenza di FHV-1 ma, in presenza di un risultato positivo l'IHC è raccomandata per confermare la diagnosi.

CAPITOLO II

COMPLESSO GENGIVITE-STOMATITE-FARINGITE LINFOPLASMACELLULARE CRONICA FELINA

2.1 Generalità sul complesso “gengivite-stomatite-faringite cronica felina”

Il complesso “gengivite-stomatite-faringite cronica felina” (GSLF) rappresenta uno dei modelli per comprendere la complessità delle interazioni tra ospite, risposta immunitaria e possibili agenti eziologici. Il complesso GSLF è rappresentato da un insieme di lesioni flogistiche, ulcerative e proliferative ad eziologia multifattoriale (Harvey CE *et al.*, 1991; Williams CA *et al.*, 1992). La GSLF è tutt’ora oggetto di molti studi e non si è ancora chiaramente compreso se le condizioni patologiche, che si riscontrano in corso di questa problematica, siano effettivamente malattie diverse o aspetti diversi di una stessa patologia (Williams CA *et al.*, 1992). Dai dati riportati in letteratura sembra che siano più colpiti i gatti di razza pura, con dati di prevalenza che raggiungono il 72% (Harvey CE *et al.*, 1991), in particolare Siamesi (Diehl K, 1993), Persiani e Abissini (Williams CA *et al.*, 1992). L’età media dei gatti con GSLF è 6/7 anni (Diehl K, 1993; White SD *et al.*, 1992).

Alcune forme di GSLF sono particolari perché colpiscono animali giovani (Williams CA *et al.*, 1992; Diehl K, 1993) e sono state classificate in:

- gengivite-periodontite giovanile segnalata in Siamesi, Maine Coons e Comuni Europei che sviluppano la patologia nei primi 9 mesi di vita, e presentano in anamnesi patologie croniche respiratorie (Williams CA *et al.*, 1992)
- gengivite giovanile iperplastica felina in Persiani e Abissini. e risulta limitata al periodo di eruzione dei denti permanenti, fino a circa un anno di età (Diehl K, 1993; Williams CA *et al.*, 1992).

Nei gatti affetti dalla forma classica di GSLF si possono rilevare infezioni croniche latenti da Calicivirus (FCV) e Virus dell’Immunodeficienza felina (FIV) e meno frequentemente da virus della Leucemia felina (FELV) (Williams CA *et al.*, 1992; Harvey CE, 1991; Diehl K, 1993). In questi soggetti si possono riscontrare intensa proliferazione batterica locale, patologie epatiche e renali, stress (Diehl K, 1993) che possono essere associate o aggravate da patologie su base immunomediata (Diehl K 1993; Williams CA *et al.*, 1992).

L’esame obiettivo generale dei gatti affetti da GSLF evidenzia risentimento generale, alitosi, ptialismo, disidratazione, anoressia e disturbi nella prensione e nella masticazione dell’alimento con dimagrimento (White SD *al.*, 1992; Harvey CE, 1991; Diehl K, 1993).

L'emocromo rileva leucocitosi, ipergammaglobulinemia nel 50% dei casi (Diehl K, 1993) e iperalbuminemia con ematocrito elevato in seguito alla disidratazione (White SD *et al.*, 1992).

L'esame obiettivo particolare del cavo orale spesso evidenzia lesioni dentali, in particolare a livello di molari e premolari superiori e solo secondariamente a livello di incisivi (Harvey CE, 1999) accumulo di placca e tartaro, esposizione di radici dentarie, lisi dei tessuti ossei periodontali, retrazione gengivale e lesioni alla mucosa. Le lesioni macroscopiche a carico della mucosa sono eterogenee e possono manifestarsi con moderato eritema, fino a ulcere, lesioni granulomatose e proliferative. Le lesioni possono limitarsi alla sede gengivale o interessare tutta la mucosa della cavità orale, estendendosi all'area glossopalatina, alle guance, alla lingua, alle labbra fino al palato duro e alla faringe (Diehl K, 1993; Williams CE *et al.*, 1992; White SD *et al.*, 1992).

La sintomatologia ha andamento ciclico con recidive frequenti caratterizzate da dolore intenso (Williams CE *et al.*, 1992).

Tutte le lesioni della GSLF sono accomunate istologicamente dal riscontro di un grave infiltrato linfoplasmacellulare a livello di lamina propria e sottomucosa. Le cellule predominanti, nelle fasi iniziali della patologia, sono i neutrofili, seguiti da linfociti, macrofagi e plasmacellule nella sottomucosa, spesso binucleate e Mott cells contenenti corpi di Russel, indice di un eccesso di produzione di immunoglobuline (Johnesse JS *et al.*, 1983; Harvey CE *et al.*, 1991; Williams CA *et al.*, 1992; White SD *et al.*, 1992).

2.2 Eziologia e patogenesi

L'eziologia della GSLF è estremamente complessa e multifattoriale (Knowles JO *et al.*, 1991; Truyen U *et al.*, 1999)

Diverse malattie e/o problematiche immunitarie possono essere presenti in concomitanza con GSLF o, secondo alcuni Autori, esserne la causa primaria. Tra le principali alterazioni e/o malattie riscontrate in corso di GSLF si possono ricordare: malattie sistemiche (insufficienza renale, patologie epatiche e respiratorie, deficit proteici) (Diehl, 1993), agenti batterici (come *Bacteroides* spp, *Actinomyces* spp., *Pasteurella multocida*, *Streptococchi*, *Moraxella* spp, *Propionibacterium* spp.,

Fusobacterium nucleatum, *Clostridium villosum*, *Listeria monocitogenes* e *Serratia marcescens*) (Lyon KF, 1990; Rochette J, 2000; Hagewald S *et al.*, 2000), agenti virali (come Calicivirus felino, virus dell'immunodeficienza virale felina, virus della leucemia virale felina e herpes virus felino di tipo 1) (Tenorio AP *et al.*, 1991; Reubel GH *et al.*, 1992; Sykes JE, 2001; Lommer MJ *et al.*, 2003; Pesavento PA *et al.*, 2004). La letteratura è concorde nell'includere i disordini immunitari nell'eziopatogenesi della GSLF che sembrano avere un ruolo predominante nel manifestarsi e nell'andamento della sintomatologia. Tra i disordini del sistema immunitario maggiormente indagati si ricordano: i deficit nell'acquisizione dell'immunità passiva, deficit ereditario nel sistema del complemento, il deficit ereditario dei neutrofilo o della loro funzione, il deficit ereditario nella funzione dei linfociti, l'assenza di citochine o dei cofattori necessari per la differenziazione dei linfociti e la disfunzione ereditaria dei monociti (Williams CA *et al.*, 1992; Diehl K, 1993; Harley R *et al.*, 2003).

Secondo Diehl (1993) nella GSLF si evidenziano anche un'immunodeficienza virale da Retrovirus e una non virale, dovuta a difetti genetici (congeniti e acquisiti). Questi deficit immunitari riducono le difese dell'ospite e favoriscono le flogosi indotte dalla flora microbica. Tale immunodeficienza si manifesta, soprattutto in associazione alle lesioni croniche, con una neutropenia ciclica o persistente (Diehl K, 1993).

Nella patogenesi della GSLF è stato osservato un caratteristico shift della risposta immunitaria: da TH1 (linfocitaria), ad una mista TH1-TH2, fino a una di tipo TH2 (anticorpale). Alcuni studi immunologici sulla GSLF hanno permesso di evidenziare le differenze nei modelli di produzione delle citochine tra i gatti sani e i malati e le caratteristiche dell'infiltrato plasmacellulare e delle immunoglobuline prodotte nei soli gatti malati (Harley R *et al.*, 2003).

Il modello di citochine secrete nella cavità orale di un gatto sano è costituito, principalmente, da IFN- γ , IL-2, IL-12 e IL-10. Nei gatti con GSLF l'espressione citochinica è costituita da: IL-12, IL-6, IL-10, IL-2, IFN- γ , IL-4 e raramente IL-5 (Tabella 1). Con il manifestarsi della GSLF si assiste ad un aumento precoce dell'espressione dell'IL-6 che è deputata alla stimolazione della differenziazione dei linfociti B e alla secrezione di immunoglobuline da parte delle plasmacellule. Con il cronicizzarsi della patologia, aumenta anche l'IL-4, che promuove ulteriormente lo shift immunitario. Questi animali presentano elevati livelli sierici di IgG, IgA, IgM e di albumine, con un'evidente ipergammaglobulinemia. Anche nelle secrezioni salivari si

evidenzia un incremento di IgG e IgM, mentre le IgA risultano stabili o addirittura diminuite. L'incremento salivare di immunoglobuline avrebbe una duplice origine: da un lato deriva dall'essudato prodotto dalla flogosi mucosale e dai danni ai tessuti del cavo orale, dall'altro è dovuto alla secrezione da parte delle plasmacellule infiltranti la mucosa. Le IgA nei gatti malati sono presenti in concentrazioni basse a livello salivare, mentre i valori sierici sono normali o addirittura aumentati. La persistenza e la resistenza della flogosi tipica della GSLF potrebbero, di conseguenza, essere imputate proprio a questo deficit nella protezione locale (Diehl K, 1993; Sykes JE, 2001; Pesavento PA *et al.*, 2004; Harley R *et al.*, 2003).

Alla patogenesi della GSLF, è necessario aggiungere l'ipotesi di trasformazione neoplastica, che sarebbe particolarmente evidente nei gatti con lesioni molto aggressive e resistenti. Kyriazidou A *et al.* (1989) hanno dimostrato che, istologicamente e immunoistochimicamente, le immunoglobuline provenienti dalle masse neoplastiche sono di tipo monoclonale per una singola catena leggera (κ o λ), con o senza espressione delle catene pesanti; mentre le immunoglobuline provenienti dai tessuti tipicamente infiammatori sono policlonali per le catene leggere e per una o più catene pesanti. La monoclonalità delle immunoglobuline prodotte nelle neoplasie delle cellule B è stata recentemente confermata da Werner *et al.* (2005), utilizzando la PCR come metodo diagnostico.

In alcuni casi di GSLF si potrebbe quindi ipotizzare una selezione clonale dei linfociti B, con trasformazione neoplastica della patologia, come conseguenza di una stimolazione antigenica persistente (Lyon KF, 1994).

La diagnosi della GSLF risulta molto difficile a causa dell'eziologia poco conosciuta e delle lesioni aspecifiche comuni ad altre patologie del cavo orale (Tabella 2).

Tabella 1: citochine prodotte nel cavo orale in corso di GSLF

Citochine	Cellule produttrici	Effetti biologici
IL-2	linfociti T	LINFOCITI T: proliferazione, aumento della sintesi delle citochine, potenzia l'apoptosi NATURAL KILLER: proliferazione, attivazione LINFOCITI B: proliferazione, sintesi di anticorpi
IL-4	linfociti Th2 mastociti	LINFOCITI B: sintesi di IgE LINFOCITI T: differenziazione TH2, proliferazione MACROFAGI: inibizione dell'attivazione mediata da IFN- γ MASTOCITI: proliferazione
IL-5	linfociti Th2	EOSINOFILI : attivazione, aumentata produzione LINFOCITI B: proliferazione, produzione di IgA
IFN- γ	linfociti Th1 cellule natural killer	MACROFAGI : attivazione LINFOCITI B: opsonizzazione, fissazione del complemento IgG mediata LINFOCITI T: differenziazione TH1 Aumento dell'espressione del MCHC I e II, aumento della processazione e della presentazione antigenica ai linfociti T

Tabella 2: alcune delle principali diagnosi differenziali in corso di GSLF

Classi malattie	Principali diagnosi differenziali
Autoimmuni e immunomediate	Lupus Pemfigo Volgare Vasculite Eritema Multiforme
Malattie da ipersensibilità	Malattie correlate al complesso del granuloma eosinofilico
Neoplasie	Carcinoma squamo cellulare Linfoma
Batteriche e/o da funghi	Stomatite ulcero-membranosa Candidasi (rara)
Meccaniche	Ustioni dovute all'elettricità Lesioni da corpo estraneo
Tossiche	Piante tossiche o irritanti (aghi di pino) Tossicosi da tallio

2.3 Obiettivi dello studio

Lo scopo di questo studio retrospettivo è stato di prendere in considerazione una patologia frequente nel gatto, ma ancora poco conosciuta, la GSLF, per valutarne i reperti istopatologici, immunoistochimici e molecolari e per approfondire alcuni elementi della sua eziopatogenesi al fine di migliorare l'approccio clinico e terapeutico nella gestione di questi pazienti.

2.4 Materiali e Metodi

In questo studio retrospettivo sono stati raccolti campioni provenienti da 30 gatti, pervenuti presso il Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, sezione di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviare, dell'Università degli Studi di Milano.

Ciascun campione è stato valutato dal punto di vista istopatologico ed immunoistochimico. Tredici campioni sono stati inoltre testati per valutarne la clonalità.

2.4.1 Valutazione istopatologica

In tutti i pazienti sono state eseguite una o più biopsie incisionali nel o nei siti più gravemente affetti. Tutti i campioni prelevati in sede intraoperatoria sono stati fissati in formalina tamponata al 10% e successivamente sottoposti ad esame istologico, utilizzando la colorazione secondo Ematossilina-Eosina, per valutare il tipo di infiltrato. I campioni sono stati esaminati dallo stesso patologo per ottenere una maggiore uniformità dei risultati.

Una parte del materiale è stato destinato alla valutazione, tramite PCR e immunoistochimica, della presenza di genoma o proteine virali di FeLV, Calicivirus e FHV-1. In alcuni casi selezionati abbiamo valutato la mono- o policlonalità della popolazione linfoide attraverso PCR per identificare il recettore delle cellule B monoclonale.

2.4.2 Tecnica di immunoistochimica

L'indagine immunoistochimica è stata effettuata su sezioni di tessuti fissati ed inclusi in paraffina secondo la tecnica Avidina-Biotina-Perossidasi (ABC) (Hsu SM *et al.*, 1981). In Tabella 3 sono riportati gli anticorpi e le condizioni di utilizzo.

2.4.3 PCR per clonalità

Il DNA è stato estratto dai tessuti fissati in formalina ed inclusi in paraffina. Sono stati ottenuti da ogni campione 4 sezioni di 25 micron, in condizioni di sterilità.

Sono state seguite le seguenti modalità: estrazione dalla paraffina; estrazione del DNA (*kit Qiamp DNA minikit, DNAeasy, Qiagen Valencia, CA*); misurazione della quantità di DNA ottenuta con lo spettrofotometro (assorbanza 260/280); diluizione del DNA alla concentrazione di 10 nanogrammi/microlitro in acqua distillata DNase e RNase free.

Reazione PCR: è stata applicata una tecnica precedentemente utilizzata da Vernau e Moore, (1999). Le sequenze dei primer contro le immunoglobuline IgH del recettore dei linfociti B non sono state fornite per motivi di patente.

Condizioni della PCR: 40 microlitri di Master Mix + 10 microlitri soluzione DNA = volume totale per reazione 50 microlitri. Sono stati utilizzati Gel commerciali Criterion (Biorad) con 16 pozzetti. In un gel sono stati fatti correre i campioni amplificati con la PCR in condizioni di DNA nativo ed in un gel i campioni amplificati PCR dopo denaturazione del DNA (prima della corsa trattamento di 15 microlitri della reazione a 95° per 10 minuti nella macchina della PCR). In ogni pozzetto sono stati posti 15 microlitri di campione e 9 microlitri di colorante. L'operazione è durata 2 ore e 20 minuti a 115 Volt in 10% TBE. La scatola è stata mantenuta in ghiaccio per evitare il riscaldamento e lo scioglimento della plastica. In ogni gel nel primo pozzetto si introducono 5 microlitri di DNA ladder di 100 paia di basi (Invitrogen Life Technologies). Nel secondo pozzetto il campione negativo (solo acqua), il campione di controllo negativo ed il campione di controllo positivo, ed i campioni esaminati.

Nella corsa della PCR si sono inclusi oltre ai campioni da testare un campione negativo (lesione infiammatoria policlonale) ed un campione positivo (linfoma B positivo per la prova).

Le condizioni della PCR sono riassunte in Tabella 4.

Tabella 3: Anticorpi utilizzati per la caratterizzazione delle stomatiti feline

Anticorpi	Retrieval antigenico	Diluizione	Isotipo	Origine
Ki67 Mib-1 (Dako [®] , Germania)	Microonde in soluzione Citrato pH 6-6,3	1:1000	IgG1	Mono-clonale Topo
Fosfoistone 3 (Upstate [®] , U.S.A)	Microonde in soluzione Citrato pH 6-6,3	1:800	Poli- clonale	Poli-clonale Coniglio
FeLVgp85/70 Clone C11D8 (Custom Monoclonals Int. [®] , U.S.A)	Microonde in soluzione Citrato pH 6-6,3	1:200	IgG2B	Mono-clonale Topo
FeLV p27 core PF12J-10° (Custom Monoclonals Int. [®] , U.S.A)	Microonde in soluzione Citrato pH 6-6,3	1:100	IgG1	Monoclonale Topo
FHV- 1 (Custom Monoclonals Int. [®] , U.S.A)	No	1: 150	IgG2A	Mono-clonale Topo
Calicivirus α FCVS19 (Custom Monoclonals Int. [®] , U.S.A)	No	1:800	IgG2A	Monoclonale Topo
Calicivirus FCV43 (Custom Monoclonals Int. [®] , U.S.A)	No	1:500	IgG2A	Monoclonale Topo
IgA (Oxford biomarketing [®] , UK)	Tripsina 37°/15'	1:200	IgG1	Mono-clonale Topo
IgM (Oxford biomarketing [®] , UK)	Tripsina 37°/15'	1:50	IgG2a	Mono-clonale Topo
IgG (Oxford biomarketing [®] , UK)	Tripsina 37°/15'	1:100	IgG1	Mono-clonale Topo

Tabella 4 : Condizioni della PCR

Temperatura in gradi centigradi	Tempo	Cicli
95 97 72	15 minuti 30 secondi 2 minuti	5 CICLI
94 70	30 secondi 2 minuti	5 CICLI
94 68	20 secondi 2 minuti	5 CICLI
68	10 minuti	1 CICLO
4	Fino all'apertura	/

2.5 Risultati

Sono stati raccolti campioni provenienti da 30 gatti, pervenuti presso il Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, sezione di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviare, dell'Università degli Studi di Milano.

Ciascun campione è stato valutato dal punto di vista istopatologico ed immunoistochimico. Tredici campioni sono stati inoltre testati per valutarne la clonalità.

Tutti i gatti sono stati sottoposti a biopsia chirurgica di tipo incisionale, ad eccezione del caso numero 1 in cui si è preferita una biopsia escissionale.

Dei 30 gatti inclusi nel lavoro 25 erano di razza Comune Europea, 2 Certosini, e 3 Persiani incrocio. Venti gatti erano maschi (3 interi e 17 orchiectomizzati) e 10 femmine (9 sterilizzate e 1 intera). L'età media era di 8 anni (range 1,1-14 anni). I test sierologici eseguiti per FIV erano positivi solo in 3 gatti, mentre tutti i soggetti sono risultati FELV negativi.

I sintomi clinici segnalati nelle schede di accompagnamento sono stati: alitosi, scialorrea, disoressia, disfagia e algia alla prensione dell'alimento. La diagnosi clinica era stomatite, faucite, gengivite ed odontoliti.

Le lesioni macroscopiche presentavano localizzazione variabile. In molti casi la sede della lesione era espressa dal clinico come cavo orale o mucosa del cavo orale. Negli altri le lesioni erano a livello di istmo delle fauci. In 2 casi (2 e 23) erano presenti ulcere linguali ed ulcere multiple del cavo orale.

I sintomi clinici riportati nelle schede anamnestiche di accompagnamento sono stati riassunti in Tabella 5 e 6.

L'esame istologico ha evidenziato la presenza di erosioni ed ulcere della mucosa, spesso associate a necrosi, in 23 casi (Figura 9-10). La mucosa risultava iperplastica e/o displasica in 4 gatti. Nei casi 2 e 23 era evidente un'estesa degenerazione del collagene. Infiltrati di plasmacellule erano presenti in tutti i casi tranne nel 23. Le plasmacellule avevano una morfologia matura ed in molti casi erano evidenti cellule di Mott e/o a fiamma (Figura 11).

La flogosi plasmacellulare era associata ad un infiltrato linfocitario in 16 casi. In 8 casi la sottomucosa presentava intensa fibroplasia e neoangiogenesi (tessuto di granulazione). In alcuni casi l'infiltrato linfoplasmacellulare si estendeva in profondità, con ostruzione dei dotti delle ghiandole salivari, e invasione della muscolatura

profonda. In 3 casi (15, 18, 27) è stata evidenziata la presenza anche di un carcinoma squamoso. Tutti i dati riguardanti l'esame istopatologico sono riassunti in Tabella 7.

Nelle lesioni l'espressione delle Immunoglobuline (Ig) era variabile con una prevalenza, da parte delle plasmacellule, di IgG in 22 casi (Figura 12), seguite dalle IgA (Figura 13) in 19 casi e dalle IgM in 9 casi. In 6 casi erano presenti prevalentemente IgG in associazione a una minor prevalenza di IgA e IgM. In 7 casi erano predominanti le IgG in associazione ad una minoranza di IgA.

In 16 casi si evidenziava positività al Virus della Leucemia Felina e in 19 gatti al Calicivirus felino.

L'espressione dell'antigene di proliferazione Ki67 è stato evidenziato in 15 casi con percentuali di positività fino al 90%, mentre l'espressione della proteina fosfoistone 3 (pH3), che indica l'entrata in mitosi delle cellule, è stata riscontrata in 8 casi. Per entrambe le proteine spesso solo la mucosa risultava positiva.

Tredici campioni sono stati testati per verificarne la clonalità, sei campioni sono risultati clonali, un campione pseudoclonale, due campioni oligoclonali, mentre i restanti casi policlonali (Figure 14-15).

Tutti i risultati riguardanti l'immunoistochimica e la clonalità sono riassunti in Tabella 8.

Tabella 5 : segnalamento, sede biopsia, sierologia dei gatti con GSLF

Caso	Razza	Sesso	Età	Sede biopsia	Sierologia
1	CE	Mc	4 aa	istmo delle fauci	FIV+; FELV-
2	CE	F	11 aa	Non pervenuto	FIV- ; FELV-
3	CERTOSINO	Mc	7 aa	mucosa orale	FIV-; FELV-
4	CE	Mc	5 aa	mucosa orale	FIV+ ; FELV-
5	CE	Mc	6 aa	cavo orale	FIV+ ; FELV-
6	CE	Fs	12 aa	regione caudale cavo orale	FIV- ; FELV-
7	CE	M	3 aa	neoformazione cavo orale	FIV- ; FELV-
8	CE	M	3 aa	neoformazione cavo orale	FIV- ; FELV-
9	CE	Fs	6,5 aa	mucosa cavo orale	FIV- ; FELV-
10	CE	Fs	8 aa	mucosa cavo orale	FIV- ; FELV-
11	CE	Fs	11 aa	mucosa cavo orale	FIV- ; FELV-
12	CE	Mc	1,1 aa	regione faringea mediale	FIV- ; FELV-
13	CE	Mc		mucosa cavo orale	FIV- ; FELV-
14	CE	Mc	13 aa	cavo orale fauce destra	FIV- ; FELV-
15	CE	Fs	10 aa	cavo orale destro e sinistro	FIV- ; FELV-
16	CE	Fs	11 aa	cavo orale	FIV- ; FELV-
17	CE	Mc	13 aa	cavo orale	FIV- ; FELV-
18	PERSIANO INCROCIO	Mc	8,5 aa	mucosa cavo orale	FIV-; FELV-
19	CE	Mc	5 aa	mucosa fauce destra	FIV- ; FELV-
20	CE	Mc	10 aa	mucosa fauce destra	FIV- ; FELV-
21	CE	M	6 aa	Istmo delle fauci destro	FIV- ; FELV-
22	PERSIANO INCROCIO	Mc	11 aa	Non pervenuto	FIV- ; FELV-
23	CE	Mc	8 aa	cavo orale e labbro superiore	FIV- ; FELV-
24	CE	Mc	10 aa	istmo delle fauci	FIV- ; FELV-
25	CE	Fs	14 aa	mucosa del vestibolo mandibolare sinistro e istmo delle fauci sinistro	FIV- ; FELV-
26	CE	Mc	3 aa	fauce sinistra	FIV- ; FELV-
27	CERTOSINO	Fs	6 aa	istmo delle fauci destro e sinistro	FIV- ; FELV-
28	PERSIANO INCROCIO	Mc	10 aa	gengiva	FIV- ; FELV-
29	CE	M	7 aa	fauce destra	FIV- ; FELV-
30	CE	Fs	4 aa	gengiva, fauce destra e gh salivare	FIV- ; FELV-

Tabella 6: sintomi clinici riportati dalle schede di accompagnamento:

Caso	Clinica
1	Alitosi, disfagia, scialorrea
2	Non pervenuto
3	Difficoltà masticatoria, alitosi
4	Anoressia
5	Alitosi, disfagia ed algia alla prensione dell'alimento
6	Non pervenuto
7	Non pervenuto
8	Non pervenuto
9	Non pervenuto
10	Non pervenuto
11	Alitosi e disfagia
12	Difficoltà respiratorie e disfagia
13	Non pervenuto
14	Disfagia, alitosi, algia
15	Non pervenuto
16	Non pervenuto
17	Non pervenuto
18	Non pervenuto
19	Non pervenuto
20	Disoressia prolungata
21	Disoressia e disfagia
22	Non pervenuto
23	Disoressia, scialorrea e zoppia al posteriore sinistro
24	Non pervenuto
25	Disoressia, alitosi e scialorrea
26	Non pervenuto
27	Disoressia, disfagia
28	Non pervenuto
29	Non pervenuto
30	Non pervenuto

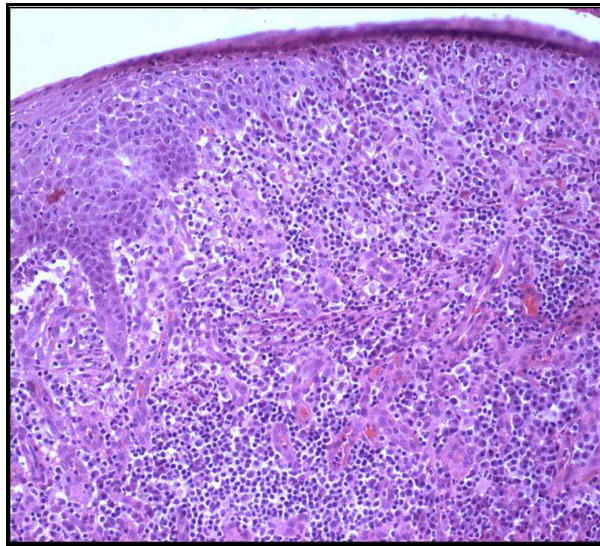


Figura 9: diffusa flogosi plasmacellulare associata a iperemia e angiogenesi nel corion gengivale con lieve iperplasia e spongiosi mucosale (EE 20X)

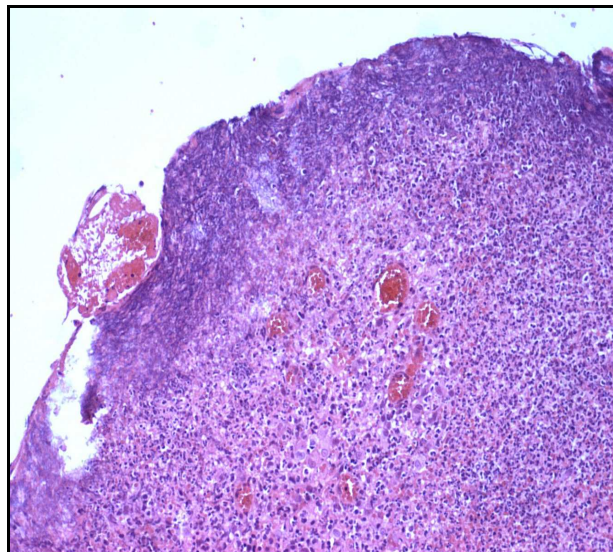


Figura 10: diffuse aree di ulcerazione associate a flogosi purulenta fibroplasia e angiogenesi del corion (EE 20X)

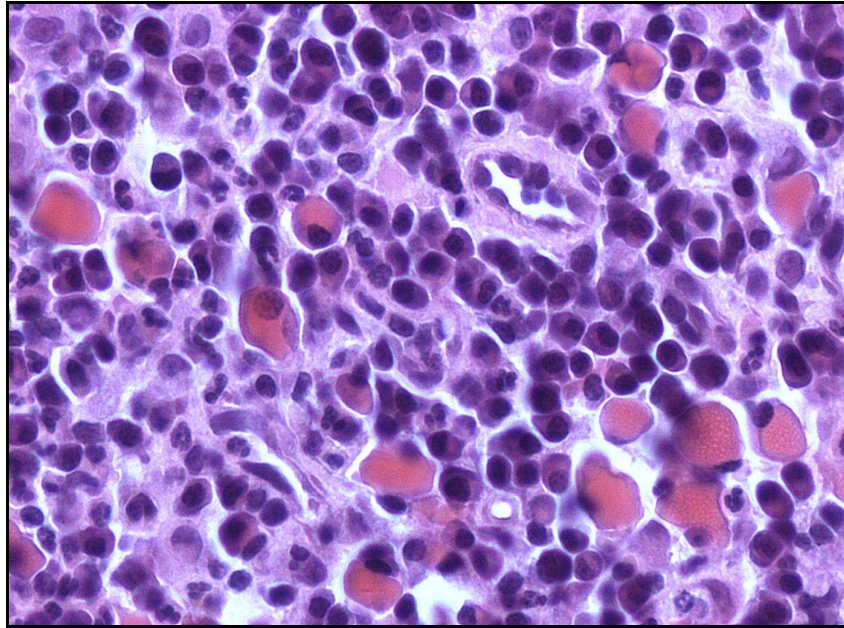


Figura 11: prevalenza di plasmacellule mature (plasmacellule a fiamma o di tipo Mott (EE 200X)

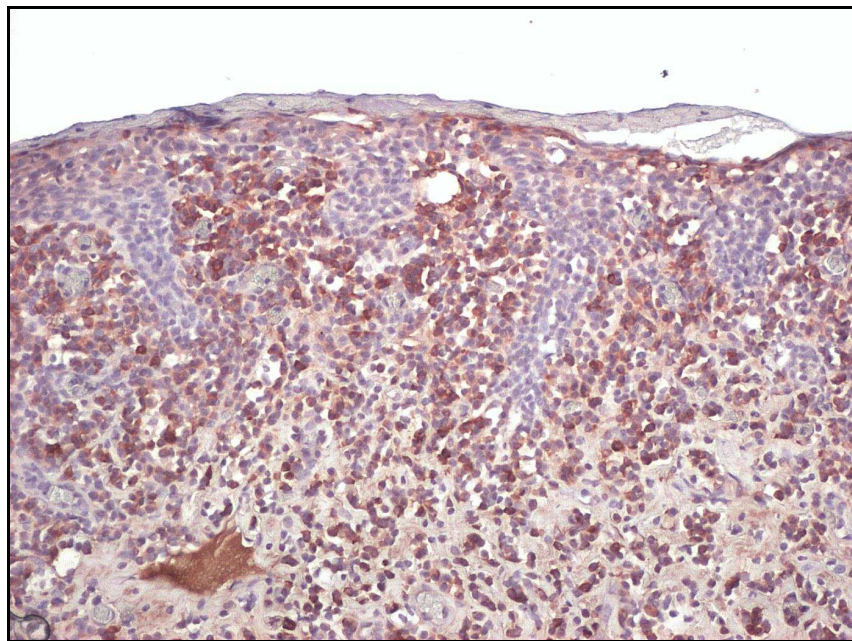


Figura 12: diffusa espressione di IgG citoplasmatiche delle plasmacellule infiltranti (IHC, anti IgG, Cromogeno Carbazolo, 100X)

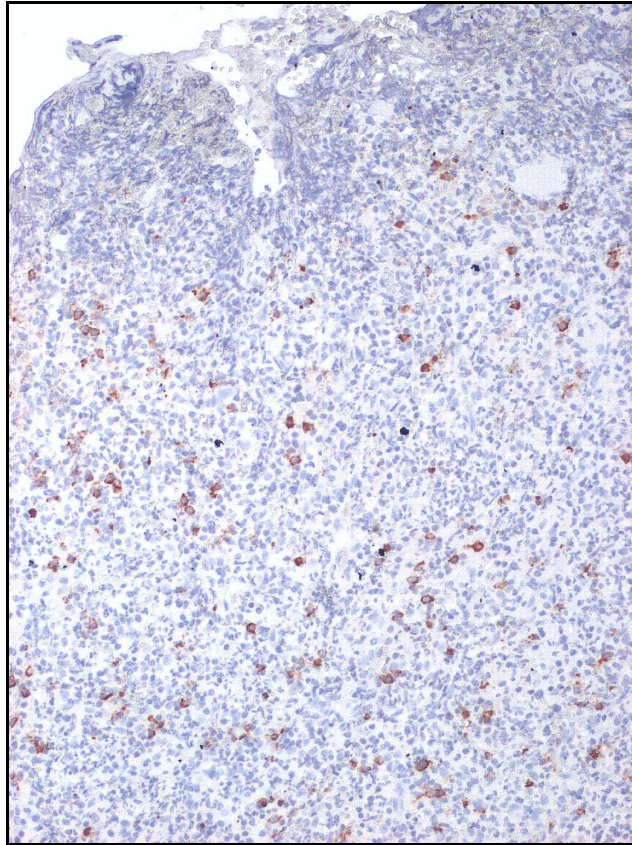
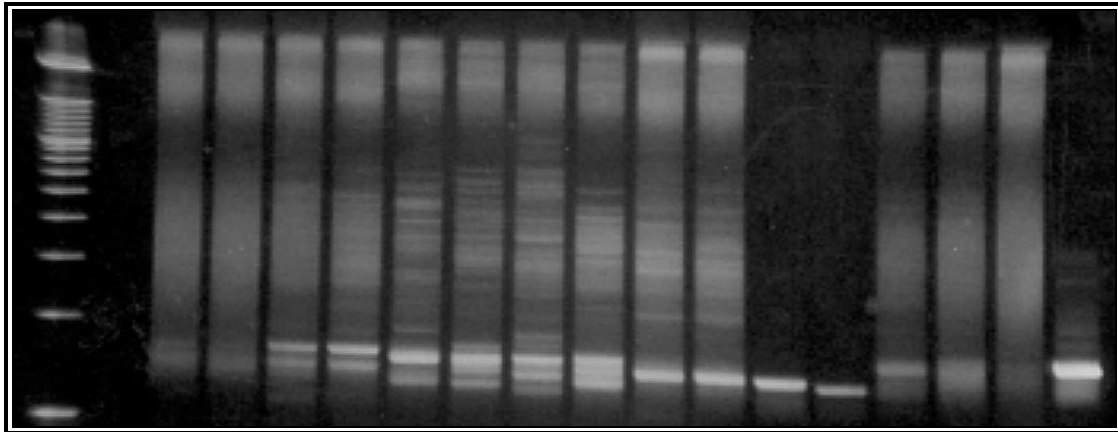
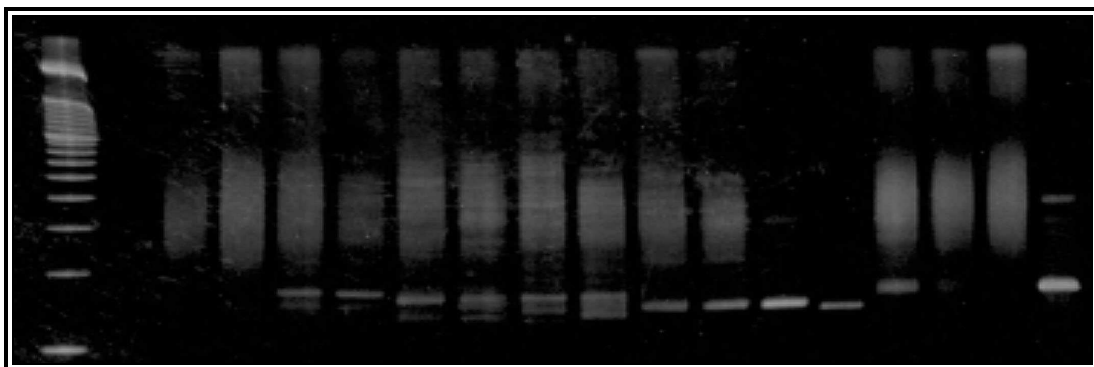


Figura 13: espressione delle IgA nelle aree lesionali (IHC, anti IgA, cromogeno carbazolo, 20X)



---1-----2-----3-----4-----5-----6-----7-----8-----9--10--

Figura 14: Risultati dell'analisi clonale tramite PCR. Corsa dei campioni amplificati con la PCR in condizioni di DNA nativo. Sette campioni e tre controlli sono posizionati a coppie nei pozzetti.



---1-----2-----3-----4-----5-----6-----7-----8-----9--10--

Figura 15: Risultati dell'analisi clonale tramite PCR. Corsa dei campioni amplificati con la PCR dopo denaturazione del DNA. Sette campioni e tre controlli sono posizionati a coppie nei pozzetti.

Legenda per PCR figure 14 e 15:

1 acqua (controllo negativo), **2.** caso n. 26: policlonale, **3.** caso n. 8: monoclonale
4. caso n. 27: da oligoclonale a monoclonale, **5.** caso n. 30: da policlonale a oligoclonale **6.** caso n. 11: monoclonale, **7.** caso n. 7: policlonale (pseudoclonale), **8.** caso n. 19: policlonale **9.** controllo: policlonale (linfonodo reattivo), **10.** controllo: monoclonale (neoplasia cute gatto)

Tabella 7: reperti istopatologici riscontrati nelle 30 biopsie provenienti da gatti affetti da GSLF

Caso	Erosioni	Ulcere	Flogosi neutrofilia	Plasmacellule	Cellule di Mott	Cellule a fiamma	Linfociti	Infiltraz. salivare
1	+	assente	+	+	rare	assente	+	assente
2	+	assente	assente	+	assente	assente	assente	plasma cellule
3		assente	+	+	assente	assente	assente	assente
4	+	assente	+	+	numerose	assente	assente	assente
5		+	+	+	moderate	assente	+	assente
6		assente	+	+	numerose	assente	+	assente
7		assente	+	+	assente	assente	+	assente
8	+	assente	+	+	assente	assente	assente	assente
9	+	assente	+	+	assente	assente	+	assente
10		assente	+	+	assente	assente	+	assente
11	+	assente	+	+	assente	assente	+	assente
12		assente	+	+	assente	assente	+	assente
13		assente	+	+	assente	assente	+	assente
14	+	assente	+	+	0-3 x campo a 400x	assente	+	linfociti e plasma cellule
15		assente	+	+	0-6 x campo a 400x	assente	+	assente
16	+	assente	+	+	1-2 x campo a 400x	assente	assente	assente
17		assente	assente	+	+	assente	assente	plasma cellule
18	+	assente	+	+	assente	assente	assente	plasma cellule
19	+	assente	+	+	assente	assente	assente	assente
20	+	assente	+	+	numerose	assente	+	assente
21		+	+	+	0-3 x campo a 400x	assente	assente	assente
22	+	assente	assente	+	occasionali	assente	+	plasma cellule e linfociti
23		+	+	assente	assente	assente	assente	assente
24	+	assente	+	+	assente	assente	assente	assente
25	+	assente	+	+	1-4 x campo a 400x	assente	+	assente
26	+	assente	assente	+	0-1 x campo a 400x	assente	assente	plasma cellule
27	+	assente	+	+	rare	assente	+	plasma cellule e linfociti
28	+	assente	assente	+	assente	assente	+	assente
29	+	assente	+	+	rare	assente	assente	assente
30	+	+	assente	+	numerose	numerose	assente	assente

Tabella 8: risultati ottenuti con immunohistochimica e clonalità

Caso	Ig			Ag					Proliferazione		Clonalità
	IgA	IgG	IgM	FHV-1	FELV p27	FELV Gp85	Calicivirus αS19	Calicivirus 43	Ki67	Fosfo Istone3	
1	10%	-	5%	-	+	+	manca la mucosa	manca la mucosa	-	-	non eseguito
2	5%	90%	10%	-	-	-	+	+/-	-	-	non eseguito
3	-	10%	-	-	-	+	+	-	-	-	clonale per FR2
4	5%	50%	10%	-	-	-	-	-	-	-	non eseguito
5	-	10%	-	-	-	+	+	+	-	-	non eseguito
6	-	60%	5%	-	-	-	-	-	-	-	clonale per FR2
7	20%	20%	-	-	-	-	+	-	-	-	policlonale
8	25%	50%	-	-	-	-	manca la mucosa	manca la mucosa	20%	-	clonale per FR2
9	-	-	-	-	-	+	-	-	10%	20%	non eseguito
10	5%	-	-	-	-	+ anche ep ghiandole	manca la mucosa	manca la mucosa	0-5%	-	clonale per FR2
11	-	-	-	-	-	+/-	+ fondo	+	-	-	clonale per FR3
12	10%	30%	20%	-	-	+	+	-	5-10%	10%	non eseguito
13	5%	60%	20%	-	-	+	+	+/-	40%	40%	oligoclonale/ clonale
14	30%	20%	-	-	-	+	+	+/-	10% mucosa +	+ solo la mucosa	non eseguito
15	-	60%	-	-	-	-	+	troppo diluito	+ solo la mucosa	-	non eseguito
16	-	50%	-	-	-	-	manca la mucosa	Manca la mucosa	-	-	non eseguito
17	10%	80%	10%	-	-	+	-	-	-	-	non eseguito
18	-	30%	-	-	-	+	+	+/-	-	-	non eseguito
19	10%	40% profonde	-?	-	+	+	+	+/-	0-5%	-	policlonale
20	-	-	-	-	-	+	+	+/-	-	-	non eseguito
21	10%	-	-	-	-	+	+	+/-	-	-	non eseguito
22	10%	20%	-	-	-	-	+	+/-	-	-	non eseguito
23	5%	-	-	-	-	-	+	-	90%	-	pseudoclonale
24	20%	50%	5%	-	-	-	-	+	+ solo la mucosa	-	clonale per FR2
25	-	60% profonde	-	-	-	+	+	-	+ solo la mucosa	+ solo la mucosa	non eseguito

26	20 %	30%	10 %	-	-	-	manca la mucosa	manca la mucosa	0-5% mucosa +	-	policlonale
27	5%	-	-	-	-	-	+	+/-	+ solo la mucosa	0-5% mucosa +	oligoclonale/ clonale
28	-	20%	-	-	-	-	-	+/-	-	-	non eseguito
29	10 %	20%	-	-	-	+	+/-	+	+ solo la mucosa	+ solo la mucosa	non eseguito
30	10 %	20%	-	-	-	-	+	-	+mucosa	+mucosa	policlonale

2.6 Discussione

In questo studio sono stati raccolti campioni provenienti da 30 gatti affetti da GSLF, pervenuti presso il Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, sezione di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviare, dell'Università degli Studi di Milano.

Il segnalamento e l'anamnesi clinica ottenuta dalle schede di accompagnamento è sovrapponibile a quanto riportato da altri autori. Nel nostro lavoro si è evidenziato un numero superiore di gatti Comuni Europei affetti da questa problematica rispetto ai dati riportati da altri studi che individuano nei gatti Siamesi, Persiani, Abissini e Burnesi le razze maggiormente colpite da GSLF (Diehl K, 1993; Williams CA *et al.*, 1992; White SD, 1992). La discordanza di tali dati va forse ricercata, a parere degli autori, nella distribuzione della popolazione felina italiana che vede una percentuale di gatti Comuni Europei maggiore rispetto ai gatti di razza pura. Un altro dato divergente rispetto a quanto riportato in letteratura è stata il ridotto numero di soggetti FIV positivi affetti da GSLF, rispetto a quanto osservato da altri autori (Williams CA *et al.*, 1992).

È noto che l'esatta eziologia della GSLF non è stata del tutto chiarita, molti agenti diversi sembrano avere un ruolo importante nel determinare l'insorgenza e l'andamento spesso ciclico di tale problematica. Sia in medicina felina che umana sono stati presi in esame agenti eziologici virali (Poulet H *et al.*, 1999; Kreutz LC *et al.*, 1997; Ramsey DT *et al.*, 2000; Sykes JE, 2001; Truyen U *et al.*, 1999; Lommer MJ *et al.*, 2003; Pesavento PA *et al.*, 2004; Dawson J *et al.*, 1993; Reubel GH *et al.*, 1992; Tenorio AP *et al.*, 1991; Knowles JO *et al.*, 1991; Harbour DA *et al.*, 1991; Yamamoto JK *et al.*, 1989; English RV *et al.*, 1994; Diehl K, 1993; Willimas CA *et al.*,

1992), batterici (Diehl K, 1993; Williams CA *et al.*, 1992; Lyon KF *et al.*, 1990; Rochette J *et al.*, 2000; Baldrias L *et al.*, 1988; Love DN *et al.*, 1989; Harvey CE, 1991; Pedersen NC *et al.*, 1998; Sims TJ *et al.*, 1990; Mallonee DH *et al.*, 1988) e chimici (Harley R *et al.*, 1999, 2003), senza la possibilità d'identificare uno specifico agente primario causale. La maggior parte degli studi hanno valutato la presenza di antigeni virali nel siero o nella saliva (Hosie MJ *et al.*, 1989; Knowles JO *et al.*, 1989; Harbour DA *et al.*, 1991; Dawson J *et al.*, 1993; Reubel GH *et al.*, 1992; Pesavento PA *et al.*, 2004; Poulet H *et al.*, 1999; Tenorio AP *et al.*, 1991; Lommer MJ *et al.*, 2003) ma non la loro persistenza a livello tissutale.

I reperti istopatologici delle biopsie analizzate hanno riscontrato un'estesa infiltrazione di plasmacellule tale dato diverge con quanto riportato in letteratura. La maggior parte degli autori descrive la presenza di piccoli linfociti maturi, solo Johnesse ed Hurvitz (1983) riportano la presenza di plasmacellule anomale, caratterizzate da binucleazione e accumulo di immunoglobuline citoplasmatiche in forma di vescicole (cellule di Mott) o diffuse (cellule a fiamma). In medicina umana tale quadro istopatologico è associato ad una stimolazione antigenica cronica e persistente (Smith ME *et al.*, 1999). Nelle nostre biopsie si è osservata un'infiltrazione delle ghiandole e della muscolatura profonda. È parere degli autori che il riscontro di questa estesa e diffusa infiltrazione plasmacellulare possa spiegare l'incremento di IgG nel secreto salivare, documentato da alcuni studi clinici (Harley R *et al.*, 2003). Il quadro istopatologico caratterizzato da reperti di iperplasia della mucosa, fibroplasia e angiogenesi, osservati sia in casi con ulcerazioni della mucosa, che in casi senza ulcerazione della mucosa indica come si crei un ambiente che può portare ad un incremento della secrezione di alcuni fattori di crescita. L'eccessiva produzione di alcuni fattori di crescita potrebbe indurre la trasformazione neoplastica dei tessuti in esame. A conferma di queste osservazioni in tre gatti inclusi nel nostro studio è stata evidenziata una grave displasia del collagene e una trasformazione della lesione flogistica in carcinoma squamoso. Reubel *et al.* (1992) hanno anch'essi descritto lo sviluppo di carcinomi squamosi nel cavo orale di gatti con GSLF cronica.

Grazie all'indagine immunoistochimica sono stati riscontrati gli antigeni proteici del Calicivirus felino nel 63% delle biopsie analizzate e tale dato può essere correlato alla positività sierologica riscontrata nel 70-85% dei gatti affetti da GSLF (Harbour DA

et al., 1991; Dawson DA *et al.*, 1993; Reubel GH *et al.*, 1992; Knowles JO *et al.*, 1991). La persistenza del Calicivirus sembra quindi indicarne un importante ruolo nello sviluppo o nel manifestarsi delle lesioni infiammatorie in corso di GSLF. Sarebbe interessante valutare, tramite sequenziazione genica dell'RNA, se i Calicivirus associati alle lesioni macroscopiche riscontrate nei gatti affetti da GSLF siano tutti dello stesso sierotipo. Alcuni autori hanno infatti evidenziato come a seconda dei diversi sierotipi il virus possa dar luogo a forme cliniche differenti: respiratorie, gastroenteriche, genitali e cutanee (Poulet H *et al.*, 1999; Pesavento PA *et al.*, 2004; Knowles JO *et al.*, 1991; Ramsey DT, 2000; Lommer MJ *et al.*, 2003; Truyen U *et al.*, 1999; Sykes JE, 2001).

Nel 53% delle biopsie si è riscontrata un'elevata positività nei confronti degli antigeni contro FELV. Nel nostro campione i gatti che erano risultati positivi a FELV a livello tissutale, non presentavano alcuna positività sierologica. Questo dato è stato già frequentemente riportato in letteratura sia per FELV che per FIV, non è quindi possibile escludere un ruolo anche se indiretto di FELV nello sviluppo della GSLF (Knowles JO *et al.*, 1989). FHV-1 non sembra essere coinvolto nella patogenesi della GSLF nemmeno nel nostro lavoro (Lommer MJ *et al.*, 2003).

I dati riguardanti l'espressione tissutale delle immunoglobuline non sono paragonabili con altri studi presenti in letteratura, in quanto nessun autore sembra aver svolto questa indagine. Nei campioni analizzati è stato possibile evidenziare la prevalenza di plasmacellule IgG secernenti. Nel 29,5% dei casi si è rilevato un aumento di IgM, normalmente assenti a livello di mucosa. L'aumento di IgM può essere interpretato come testimonianza della presenza di una flogosi subacuta e di durata non superiore ai 15 giorni, periodo in cui la sintesi di IgM si arresta. Le IgA in condizioni normali costituiscono l'istotipo prevalente nella mucosa in quanto si concentrano intorno alle ghiandole salivari e sono secrete con la saliva, per proteggere il cavo orale dagli antigeni esterni mentre nelle biopsie del nostro campione erano in quantità minore rispetto alle IgG. Nel 33% dei nostri campioni le IgA erano del tutto assenti. I nostri dati di distribuzione delle immunoglobuline possono essere correlate ad un altro studio riportato in letteratura (Harley R *et al.*, 2003) che evidenzia un incremento di IgG nella saliva di gatti affetti da GSLF, associato ad un contemporaneo decremento nella secrezione di IgA.

I risultati ottenuti grazie all'indagine immunistoichimica contribuiscono ad avvalorare l'ipotesi che in corso di GSLF si verifichi un'alterazione del tipo di risposta immunitaria, che in condizioni normali è di tipo Th1, cellulomediata. Nei gatti con GSLF è stato osservato uno shift anomalo del sistema immunitario, grazie alle citochine presenti, verso un profilo di tipo umorale, Th2, associato ad un'ipereattività dei linfociti B (Diehl K, 1993; Williams CA *et al.*, 1992; Harley R *et al.*, 2003).

La possibile trasformazione neoplastica delle lesioni macroscopiche in corso di GSLF è stata formulata in seguito all'osservazione che molti gatti con GSLF non guariscono e quindi alla possibile trasformazione in senso neoplastico della popolazione plasmacellulare presente nelle lesioni già riscontrata in medicina umana (Smith ME *et al.*, 1999). Nel 48% dei gatti inclusi nello studio, la popolazione plasmacellulare proliferava sulla base dell'espressione dell'antigene Ki67. Tale presenza è indicativa di un'anomalia all'interno della popolazione plasmacellulare, normalmente considerata popolazione di cellule terminali, che è stata confermata dall'identificazione dell'espressione del fosfoistone3, che identifica le cellule in mitosi. L'espressione dell'antigene Ki67 e del fosfoistone3 suggeriscono una possibile trasformazione delle plasmacellule all'interno dei tessuti lesi in senso neoplastico. Alla luce di questi risultati in una parte dei campioni è stata eseguita una valutazione molecolare, con lo scopo di indagare se la popolazione cellulare avesse subito una selezione a carattere clonale (in condizioni normali la risposta immunologica è di tipo policlonale). In 5 casi presi in esame è stata riscontrata una trasformazione clonale, mentre in 2 casi su 13 è stata evidenziata una oligoclonalità. Questi dati suggeriscono che lo stimolo antigenico persistente può aver provocato la progressiva selezione oligoclonale e successivamente monoclonale dei linfociti B, come suggerito anche da Lyon (1994). La selezione clonale delle plasmacellule potrebbe derivare dall'impossibilità di eliminare completamente l'antigene scatenante, con conseguente persistenza di alcuni epitopi antigenici oppure potrebbe essere provocata da una mutazione genetica.

Con questo lavoro è stato possibile approfondire l'eziopatogenesi della GSLF ed in particolare: il ruolo del virus FeLV, la persistenza tissutale del Calicivirus felino, l'anomala ed eccessiva stimolazione dell'immunità umorale, secondaria alla persistenza antigenica, con possibile trasformazione neoplastica.

CAPITOLO III
GRANULOMA COLLAGENOLITICO LINEARE FELINO

3.1 Le malattie correlate al complesso del granuloma eosinofilico felino

Il complesso del granuloma eosinofilico felino (CGE) è un'entità in dermatologia felina conosciuta e studiata da diversi anni ma, nonostante i numerosi progressi condotti nella sua caratterizzazione, rappresenta tutt'oggi un complesso di malattie poco definite e fonte di frequenti fallimenti terapeutici (Rosenkrantz WS, 1993; Fondati A *et al.*, 2002).

Il granuloma collagenolitico lineare è una delle tre lesioni che classicamente costituiscono le malattie correlate al complesso del granuloma eosinofilico felino (CGE). Le altre lesioni che fanno parte di questa triade di malattie sono la placca eosinofila e l'ulcera indolente (Scott *et al.*, 2000). Sono state descritte anche altre varianti, come l'ipersensibilità alla puntura d'insetti o forme a predisposizione familiare, che vengono ormai comprese nel CGE. Le lesioni caratteristiche del CGE possono presentarsi contemporaneamente o sequenzialmente sullo stesso animale, possono associarsi ad eosinofilia tessutale e/o ematica (Gross TL *et al.*, 2005). Il granuloma eosinofilico felino è un termine generico utilizzato per identificare più tipi di lesioni macroscopiche che possono interessare la cute, le giunzioni muco cutanee e la mucosa orale. L'aspetto eterogeneo delle lesioni ha come denominatore comune l'aspetto istopatologico e la possibile eziologia allergica (Gross TL *et al.*, 2005; Merchant SR, 1994).

È importante evidenziare che il riscontro di queste patologie non è di per sé una vera diagnosi ma solo la descrizione di un quadro clinico o di un tipo di reazione cutanea e/o muco cutanea a molteplici agenti eziologici, anche molto differenti tra loro (Mason KV *et al.*, 1998).

3.2 Eziopatogenesi del CGE

La cute del gatto è considerata particolare e specifica nel suo modo di reagire ad antigeni differenti, in linea generale in questa specie si osserva un intervento di mastociti e granulociti eosinofili superiore rispetto alla specie canina (Fondati A *et al.*, 2001).

Gli eosinofili sono spesso coinvolti nelle reazioni infiammatorie degli epiteli come avviene nelle vie aeree, nella mucosa che riveste il tubo digerente, nella cute, nell'occhio e, a volte, nella vescica. Originano nel midollo osseo e rimangono nel

torrente circolatorio solo per 30 minuti prima di migrare nei tessuti, dove hanno un'emivita di 12 giorni (Tizard IR, 2009). Gli eosinofili contengono 2 tipi di granuli: i piccoli o primari, costituiti da arilsulfatasi, perossidasi e fosfatasi acida e i granuli grossi cristalloidi con una parte centrale, detta core, composta da proteina basica maggiore (MBP) circondata da una matrice di proteine eosinofile cationiche la perossidasi eosinofila e le neurotossine (Tizard IR, 2009). Le molecole rilasciate dai granuli degli eosinofili sono molte e vengono elencate in Tabella 1. L'esatto meccanismo che porta alla degranulazione degli eosinofili nel gatto è ancora poco conosciuto.

Tabella 1: molecole rilasciate dagli eosinofili (da Tizard modificato)

Classi	Molecole
Enzimi	Fosfolipasi D Lisofosfolipasi Istaminasi Catalasi
Chemochine	CXCL8 CCL3 CCL5
Citochine	IL-1 α ; IL-2; IL-3; IL-4; IL-6; IL-10; IL-16; TGF- α ; TGF- β ; TNF- α ; GM-CSF; PDGF
Proteine di granuli cationici	Proteina basica maggiore (MBP) Proteina cationica Neurotossina Perossidasi
Mediatori lipidici	Prostaglandine Leucotrieni PAF
Molecole ossidative	O ₂ ⁻ H ₂ O ₂

I mastociti giocano un ruolo fondamentale nella chemiotassi degli eosinofili e nella loro attivazione soprattutto nella specie felina. Se sensibilizzate queste cellule possono degranulare e rilasciare enzimi proteolitici e mediatori proinfiammatori (Tabella 2) nei tessuti circostanti anche sotto l'influenza di stimoli di intensità minima (Tizard IR, 2009).

Tabella 2: principali mediatori rilasciati in seguito alla degranolazione dei mastociti (da Tizard modificato)

Classi	Molecole
Granuli rilasciati tramite esocitosi (secondi, minuti)	Istamina Serotonina Tryptasi Callicreina Proteasi Proteoglicani
Citochine (alcune ore)	IL-4; IL-5; IL-6; IL-13; TNF- α ; MIP-1 α
Eicosanoidi (minuti)	Leucotrieni Prostaglandine PAF

La presenza dei mediatori proinfiammatori e degli enzimi proteolitici è responsabile della degenerazione del collagene, reperto caratteristico in corso di CGE. Il collagene degenerato si presenta come un corpo estraneo che può calcificare ed essere eliminato attraverso l'epidermide (Fondati A *et al.*, 2002; Bardagi M *et al.*, 2003).

Si ritiene che le malattie correlabili al complesso del granuloma eosinofilo felino (che continueremo per comodità ad indicare con la sigla: CGE) siano dovute principalmente a cause allergiche e parassitarie che possono complicarsi con l'instaurarsi di infezioni batteriche (Mason KV *et al.*, 1998; Merchant SR, 1994).

È stato ipotizzato che nei gatti con CGE esista una predisposizione genetica a sviluppare una risposta eccessiva di tipo eosinofilo verso stimoli antigenici specifici (Power HT *et al.*, 1990-1995; Rosenkrantz WS, 1993). Tale ipotesi si basa sull'osservazione di una colonia di gatti SPF a discendenza comune in cui si

evidenziava lo sviluppo spontaneo di CGE (Power HT, 1990), questo spiegherebbe, almeno in parte perché la prevalenza della malattia è bassa in condizioni naturali, in rapporto alla frequenza degli stimoli antigenici in grado di provocarla.

Alcuni studi hanno proposto un'eziologia infettiva in seguito al rinvenimento di agenti nelle lesioni (Mason K *et al.*, 1991; Russel RG *et al.*, 1988). In questi casi è possibile che il meccanismo immunologico che scatena le lesioni sia una reazione d'ipersensibilità mediata da mastociti e IgE in cui predominano le citochine prodotte dai linfociti Th2 (IL-4, IL-5) che favoriscono la chemiotassi e l'attivazione degli eosinofili.

I risultati di alcuni studi hanno evidenziato il possibile ruolo dell'allergene di origine felina (*Felis domesticus 1*), contenuto nella saliva e nel pelo del gatto (Wisselink MA *et al.*, 2001). Secondo quest'ultima ipotesi l'autosensibilizzazione si realizzerebbe tramite l'introduzione per via percutanea, con il grooming continuo, dell'auto-allergene su una cute non intatta. Tuttavia la riproduzione sperimentale di questa osservazione non ha dato gli stessi risultati: applicando l'allergene sulla cute erosa non si sono osservati infiltrati eosinofili tra le cellule infiammatorie nelle 48 ore successive all'applicazione (Scott DW, 2001).

Le cause associate al CGE possono essere numerose: virali, genetiche, batteriche, autoimmuni, parassitarie ed allergiche (Tabella 3).

Tabella 3: ipotesi eziologiche del CGE

Classi malattie	Esempi eziologie
Allergie	Aereoallergeni Morso di pulce Puntura di zanzara Allergia alimentare Parassiti intestinali (spesso elminti)
Agenti chimici	Sostanze irritanti (contatto)
Reazioni da corpo estraneo	Parti di acari o di altri insetti
Infezioni batteriche	
Parassiti	Cheyletiella spp. Otodectes cynotis Notoedres cati
Virali	Calicivirus Poxvirus Herpesvirus
Idiopatiche	

3.3 Aspetti clinici e diagnostici generali del CGE

Le lesioni macroscopiche da CGE si presentano generalmente ben delimitate, sono caratterizzate da papule-noduli-ulcere (Scott *et al.*, 2000). Questo aspetto è forse dovuto alla presenza di edema persistente a livello dermico dovuto ai mediatori, soprattutto proteine cationiche, liberati dai granuli degli eosinofili e, in alcuni casi, alla reazione infiammatoria granulomatosa (Merchant SR, 1994).

Il prurito è variabile, da assente a molto intenso.

L'insorgenza del CGE può essere acuta o progressiva ed il decorso clinico è variabile. In alcuni gatti si osserva una risoluzione spontanea senza recidive ma, nella maggioranza dei soggetti colpiti dopo una prima risoluzione, spontanea o indotta terapeutamente, le lesioni recidivano (Rosenkrantz WS, 1993).

L'anamnesi e l'andamento stagionale delle lesioni macroscopiche spesso fanno ipotizzare una causa allergica così come la localizzazione e la manifestazione della sintomatologia (leccamento eccessivo, alopecia autoindotta, dermatite miliare, eritema e edema di muso, orecchie e palpebre).

Nelle forme familiari si ha una prima manifestazione della sintomatologia al di sotto dei due anni d'età e recidive, anche gravi, a distanza di mesi e/o anni (Rosenkrantz WS, 1993).

L'aspetto clinico, spesso caratteristico delle lesioni macroscopiche è un altro elemento importante che può aiutare nella formulazione della caratterizzazione della malattia.

L'esame istopatologico spesso si rende necessario per eliminare altre possibili diagnosi differenziali (Tabella 4) che si presentano con quadri macroscopici sovrapponibili soprattutto quando la distribuzione clinica delle lesioni da CGE non è caratteristica (dorso, faccia) o nel caso in cui la risposta al protocollo terapeutico non sia quella attesa (Fondati A *et al.*, 2001-2002).

Tabella 4: possibili diagnosi differenziali delle diverse forme di CGE

Aspetto macroscopico CGE	Possibile diagnosi differenziale
Ulcera indolente	Carcinoma squamocellulare Mastocitoma Infezione da Herpesvirus o Calicivirus Criptococcosi
Placche eosinofiliche	Linfoma cutaneo epiteliotropo Mastocitoma Carcinoma squamocellulare Demodicosi Infezione da Poxvirus Micosi sistemiche e/o sottocutanee Micobatteriosi Ascesso cronico Xantoma
Granulomi/ulcere eosinofiliche orali	Carcinoma squamocellulare Fibrosarcoma Linfoma cutaneo epiteliotropo Complesso pemfigo GSLF Infezione da Herpesvirus o Calicivirus
Placche e granulomi	Pododermatite plasmacellulare Ascesso da morso Dermatite da contatto Neoplasie Infezione da Herpesvirus, Calicivirus o Poxvirus
Ipersensibilità alla puntura degli insetti	Dermatofitosi Complesso pemfigo Allergia alimentare Rogna notoedrica Demodicosi

3.4 CGE felino e Sindrome di Wells' umana

La sindrome di Wells', detta anche cellulite eosinofila, in medicina umana è considerata il corrispettivo del granuloma eosinofilo felino soprattutto per l'aspetto istopatologico delle lesioni e per l'andamento clinico della sintomatologia (Bardagi M *et al.*, 2003).

Nella sindrome di Wells', come nel CGE, l'eziopatogenesi è sconosciuta anche se tra i fattori scatenanti più comuni si riconoscono morsi di artropodi e malattie parassitarie. Anche in questa sindrome si è ipotizzata una predisposizione genetica a sviluppare una risposta infiammatoria eosinofila "eccessiva", infatti alcuni studi riportano l'insorgenza in bambini di genitori affetti (Fitzpatrick's, 2003).

Nell'essere umano le lesioni appaiono come papule e placche edematose, solide, a volte pruriginose e/o dolenti (Bardagi M *et al.*, 2003), inizialmente sono eritematose e leggermente rilevate per poi diventare in pochi giorni molto edematose, con bordi violacei e vescicole in superficie.

Le lesioni si manifestano soprattutto a carico degli arti inferiori anche se si possono riscontrare in altre parti del corpo. Si riscontrano isolate o a gruppi (Fitzpatrick's, 2003). Come avviene nella specie felina possono guarire spontaneamente nell'arco di pochi giorni o persistere per settimane e dare recidive molto frequenti.

Le placche edematose e infiltranti in corso di sindrome di Wells' sono caratterizzate istologicamente da foci di materiale eosinofilo amorfo nel derma (figure a fiamma) (Fitzpatrick's, 2003).

Nella sindrome di Wells', così come presumibilmente accade nel CGE, il contenuto dei granuli eosinofili viene rilasciato nel derma intorno a fibre collagene non degenerate. Nella sindrome di Wells' le fibre collagene al centro delle figure a fiamma hanno un'ultrastruttura normale (Bardagi M *et al.*, 2003) e quindi non sono ritenute il target primario della patologia come avviene invece per altre malattie immunomediate o autoimmuni (Bardagi M *et al.*, 2003).

3.5 Granuloma collagenolitico lineare

Il granuloma collagenolitico lineare è stato correlato, come per le altre malattie del CGE, allo sviluppo di reazioni d'ipersensibilità di 1 tipo che si instaurano in corso di dermatite allergica al morso delle pulci, allergia alimentare, dermatite atopica, ipersensibilità al morso degli insetti, punture di insetto, predisposizione genetica, infezioni virali (soprattutto calicivirus) e batteriche (Rosenkrantz SW, 1993).

3.6 Lesioni macroscopiche

L'aspetto macroscopico più caratteristico del granuloma collagenolitico, detto anche granuloma lineare o granuloma eosinofilo, è una lesione lineare ben circoscritta, rilevata, compatta, gialla-rosa, localizzata, nella maggior parte dei casi, sul profilo posteriore delle cosce, bilateralmente o monolateralmente occasionalmente viene segnalata in mento, ascelle, zampe e cavità orale.

L'andamento lineare delle lesioni è raro in dermatologia. Si è ipotizzato che seguano le linee di Blaschko, che hanno andamento lineare negli arti (Bardagi M *et al.*, 2003). Tali linee cutanee derivano embriologicamente da un singolo clone cellulare che dà origine all'epidermide di un'area anatomica precisa.

Generalmente il granuloma lineare è asintomatico e non alopecico, ma si può ulcerare e in questo caso si possono osservare dei granuli biancastri costituiti da collagene degenerato (Gross TL *et al.*, 2005; Scott, *et al.*, 2000). Raramente si manifesta con delle lesioni papulo-nodulari a carico di mento, plica labiale, padiglioni auricolari, cuscinetti plantari e cavo orale (Gross TL *et al.*, 2005).

Colpisce gatti di tutte le razze, particolarmente soggetti giovani, da 5 a 6 mesi e femmine (Rosenkrantz SW., 1991-1993).

Può essere associato a ulcera indolente e placche eosinofile. Può risolversi spontaneamente e recidivare anche a distanza di mesi o anni (Rosenkrantz SW., 1993).

3.7 Reperti istopatologici

Il reperto istopatologico diagnostico in corso di granuloma lineare è rappresentato da estesi foci di degranulazione eosinofila attorno a fibre collagene (caratteristiche “figure a fiamma” Figura 18) (Fernandez CJ *et al.*, 2000; Gross TL *et al.*, 2005). L'epidermide si presenta moderatamente acantotica, occasionalmente con aree di erosione, ulcerazione e si può riscontrare essudazione neutrofila e linfocitaria. Il derma contiene estesi foci di degranulazione eosinofila acellulare e irregolare che si dispongono intorno a fibre collagene, caratteristiche figure a fiamma (Fondati A *et al.*, 2001; Gross TL *et al.*, 2005). La colorazione tricromica di Masson permette di evidenziare la degenerazione delle fibre collagene, o collagenolisi (Fernandez CJ *et al.*, 2000). La microscopia elettronica delle figure a fiamma evidenzia una degenerazione ed una degranulazione degli eosinofili intorno a fibre collagene all'apparenza normali (Bardagi M *et al.* 2003). Le figure a fiamma appaiono spesso disposte a “palizzata” e circondate da macrofagi e cellule giganti (Gross TL *et al.*, 2005).

Il derma si presenta diffusamente infiammato con infiltrati di eosinofili, macrofagi attivati, mastociti e rari linfociti. Si può osservare la presenza di mucina e/o di edema nel derma. Nelle lesioni cronicizzate l'infiammazione eosinofila si riduce mentre un discreto numero di macrofagi e cellule giganti si concentra intorno alle fibre collagene (Gross TL *et al.*, 2005).

Le diagnosi differenziali, con un quadro istopatologico ricco di figure a fiamma, non sono molte. La degranulazione eosinofila è osservata occasionalmente nell'ulcera indolente, anche se in questo quadro istopatologico la degranulazione è più intensa intorno alle aree ulcerate (Gross TL *et al.*, 2005). Nell'ipersensibilità alla puntura degli insetti e alla reazione avversa al cibo si riscontrano piccoli foci di degranulazione eosinofila intorno alle fibre collagene. Nelle lesioni cutanee da FHV-1 si osserva una prominente degranulazione eosinofila all'interno dei follicoli piliferi (follicolite murale eosinofila) e, quando presenti, il riscontro dei corpi inclusi intranucleari caratteristici aiuta nella diagnosi (Gross TL *et al.*, 2005). Gli elementi microscopici che possono assistere nella diagnosi differenziale vengono elencati in tabella 5.

L'interpretazione istopatologica in corso di granuloma eosinofilo può indirizzare verso una diagnosi ma, senza un'adeguata descrizione clinica, non è, di per sé, diagnostico (Gross TL *et al.*, 2005).

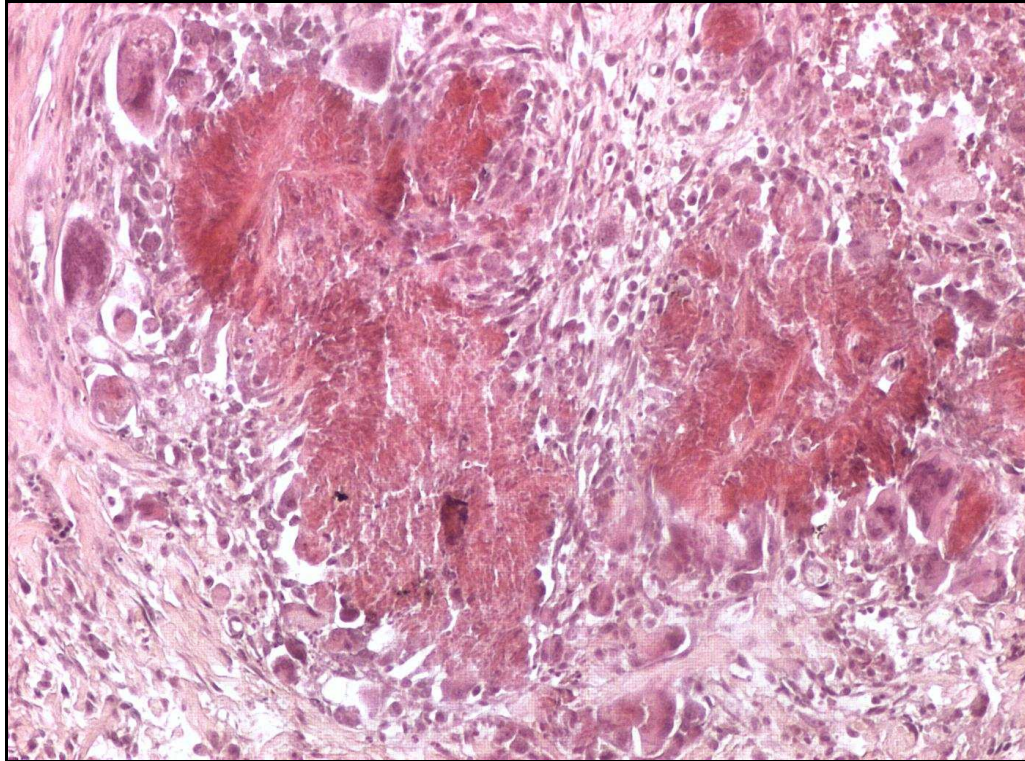


Figura 18: estesi foci di degranolazione eosinofila intorno a fibre collagene, caratteristiche “figure a fiamma” (Colorazione EE, 200X)

Tabella 5: principali differenze istopatologiche tra granuloma eosinofilo e altri quadri istologici a degranolazione eosinofila

Quadri istologici	Principali differenze istopatologiche
Ulcera indolente	Degranolazione più intensa intorno alle aree ulcerate
Ipersensibilità alla puntura degli insetti e reazione avversa al cibo	Acantosi, spongiosi, erosioni, ulcerazione ed essudazione con infiammazione eosinofila del derma che può dare quadri di “figure a fiamma”
Lesioni cutanee da FHV-1	Prominente degranolazione eosinofila all'interno dei follicoli piliferi (follicolite murale eosinofila). Corpi inclusi intranucleari (se visibili)

3.8 Obiettivi dello studio

L'aspetto macroscopico più caratteristico del granuloma collagenolitico, detto anche granuloma lineare o granuloma eosinofilico, è una lesione lineare ben circoscritta, rilevata, compatta, gialla-rosa, localizzata, nella maggior parte dei casi, sul profilo posteriore delle cosce bilateralmente. L'andamento lineare delle lesioni è raro in dermatologia. Per questi motivi si è investigata un'origine vascolare delle lesioni microscopiche (vasculite eosinofilica) ed in particolare la presenza di una possibile linfangite alla base dello sviluppo delle lesioni iniziali che spiegherebbe anche l'aspetto tipico delle lesioni macroscopiche.

Lo scopo del presente lavoro è stato di valutare questa ipotesi in alcuni casi di granuloma collagenolitico lineare.

3.9 Materiali e metodi

In questo studio retrospettivo sono state selezionate 22 biopsie cutanee di gatti con un quadro lesionale macroscopico e istopatologico compatibile con granuloma collagenolitico lineare pervenuti presso il Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, sezione di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviare, dell'Università degli Studi di Milano (2003-2009) e presso il laboratorio di analisi veterinarie di Torino (2009).

Ciascun campione è stato valutato dal punto di vista istopatologico ed immunoistochimico.

Dei 22 gatti inclusi nel lavoro 18 erano di razza Comune Europea, 2 Siamesi, 1 Norvegese e 1 Abissino. Undici gatti erano maschi (6 interi e 5 orchiettomizzati) e 11 femmine (6 sterilizzate e 5 intere). L'età media era di 2,7 anni (range 4 mesi-10 anni). I sintomi clinici segnalati nelle schede di accompagnamento sono stati: eritema, erosione, placca, ulcera, alopecia tutte ad andamento lineare e/o serpiginoso. Le lesioni macroscopiche presentavano localizzazione tipica al treno posteriore (addome, inguine, coscia). I criteri d'inclusione nello studio erano rappresentati dal caratteristico andamento delle lesioni macroscopiche associato ad una diagnosi istopatologica iniziale di granuloma collagenolitico lineare. I criteri d'esclusione delle biopsie erano rappresentati dal rinvenimento di corpi inclusi di origine virale, di agenti infettivi di altra origine e di corpi estranei.

3.9.1 Esame istopatologico

Tutte le sezioni originali colorate con ematossilina-eosina sono state riesaminate per escludere con certezza la presenza di corpi inclusi eventualmente non evidenziati nel corso del primo esame istopatologico.

Delle nuove sezioni (5-6 micron) sono state ottenute dai blocchetti in paraffina originali e colorate con ematossilina-eosina per valutare il tipo di infiltrato presente. In aggiunta le sezioni sono state sottoposte a colorazioni speciali: PAS, Ziehl-Neelsen, Gram per identificare eventuali agenti eziologici.

3.9.2 Immunoistochimica per l'identificazione di CD31 e FVIII

Le biopsie sono state sottoposte ad indagine immunoistochimica dell'espressione dei markers di proliferazione CD31 e del Fattore VIII.

Queste molecole sono espresse da endoteli vasali quali quelli di vasi ematici e linfatici.

Per il CD31 (DAKO, Glostrup, Germany) è stato utilizzato un anticorpo monoclonale di topo (1:20) mentre per il FVIII (DAKO, Glostrup, Denmark) si è impiegato un anticorpo policlonale di coniglio (1:200).

L'indagine immunoistochimica è stata realizzata partendo da sezioni di tessuti inclusi in paraffina. Sezioni di tessuto di 5 µm di spessore sono state montate su vetrini polilisinati (Superfrost Plus Slides-Menzel Glasser[®], Brasnschweig-D). Hanno subito un processo di sparaffinatura in xilene (Xilolo 1 15'; Xilolo 2 15') e sono state reidratate in alcool a gradiente discendente (Alcool assoluto 1 5'; Alcool assoluto 2 5'; Alcool 95° 2'; Alcool 70° 2') ed un successivo lavaggio con soluzione tampone (Tampone Tris 3').

Lo smascheramento antigenico è stato effettuato con forno a microonde e con pepsina (15 minuti a 37°C). E' stata applicata la soluzione di blocking (con siero normale di cavallo e con siero di capra per 20'). La soluzione di anticorpo diluita in tampone 1:20 e 1:200 rispettivamente per i due diversi anticorpi, è stata applicata alle biopsie così allestite e incubate overnight a 4°C.

L'eccesso di anticorpo è stato eliminato con risciacqui in tampone TRIS (pH 7.6; 3 cambi da 10') e le sezioni sono state successivamente incubate con complesso ABC (sistema biotina-avidina-perossidasi per 30' + 30').

Tutte le sezioni sono state sottoposte a 3 cicli di lavaggi (Tris, di 10') e sviluppate con 3-amino-9-ethylcarbazoio (AEC per 15'). Le sezioni sono state quindi lavate con

acqua corrente (4') e contro-colorate con emallume di Mayer (1'), disidratate in alcool, immerse in xilolo e montate con balsamo sintetico Eukit (Merk®).

3.10 Risultati

Sono state esaminate complessivamente 22 biopsie cutanee.

Tutti i gatti sono stati sottoposti a biopsia di tipo incisionale, con punch bioptici 4-8mm o escissionale, a lama.

Le sezioni provenivano da 18 gatti comuni europei, 2 siamesi, 1 norvegese e 1 abissino. Undici gatti erano maschi (6 interi e 5 orchiettomizzati) e 11 femmine (6 sterilizzate e 5 intere). L'età media era di 2,7 anni (range 4 mesi-10 anni).

Non è stato possibile conoscere lo stato di salute dei soggetti e la presenza di eventuali malattie sistemiche sottostanti.

Dall'analisi delle schede anamnestiche di accompagnamento i soggetti risultavano presentare una lesione macroscopica mono o bilaterale compatibile con un granuloma collagenolitico lineare.

Tutte le colorazioni speciali: PAS, Ziehl-Neelsen, Gram per identificare eventuali agenti eziologici sono risultate negative.

Nei campioni selezionati l'impiego di CD31 e FVIII ha permesso di evidenziare l'andamento del processo infiammatorio granulomatoso che si organizzava, progressivamente, intorno ai vasi (caso 1,2,3,4,8,9,10,13,14,16,17,18,19,20,21,22).

In 16 dei campioni analizzati l'aspetto istopatologico e la realizzazione dell'immunoistochimica hanno permesso di evidenziare l'organizzazione di istiociti e/o eosinofili intorno ai vasi associata a vasculite (Figura 19). I vasi si sono sospettati di origine linfatica ma non avevamo a disposizione dei marker specifici.

Le biopsie provenivano da gatti con un'età compresa tra i 4 mesi e i 10 anni, di questi 6 erano maschi, 3 maschi castrati, 3 femmine e 4 femmine sterilizzate. Tutti i soggetti risultati positivi erano gatti comuni europei tranne 2 siamesi e 1 norvegese.

14 biopsie cutanee provenivano dalla regione inguine/faccia posteriore delle cosce, 1 dalla spalla e in 1 biopsia la scheda anamnestica riportava una lesione ad andamento lineare che, a partenza dal torace arrivava fino agli arti anteriori.

Tutti i dati relativi al segnalamento, alla sede bioptica, all'aspetto macroscopico di tutti i soggetti sono stati riassunti in tabella 6 e la descrizione istologica in tabella 7.

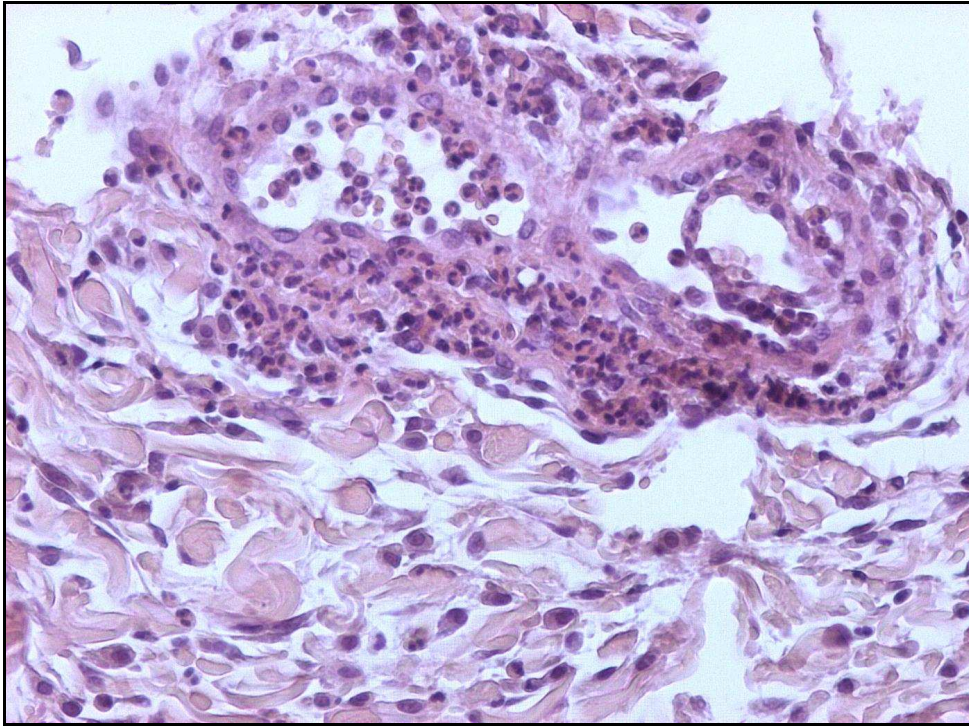


Figura 19: derma con estesi foci di degranulazione eosinofila concentrata intorno ai vasi e a livello subintimale con richiamo di cellule infiammatorie dal derma circostante

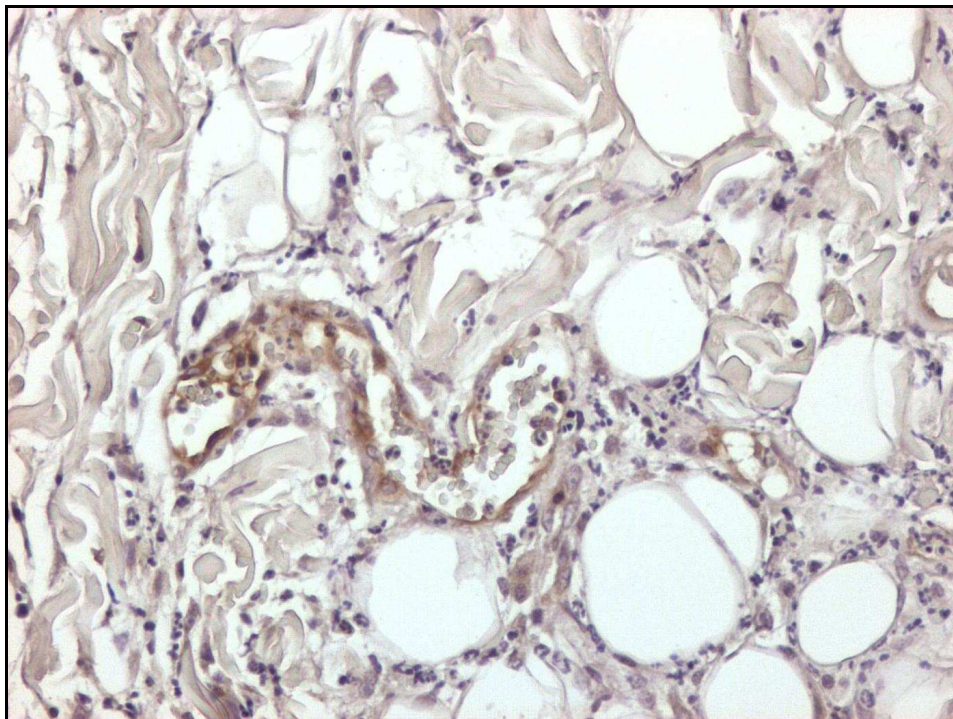


Figura 20: espressione del marker di proliferazione (FVIII) attorno a vasi danneggiati e attivati (IHC)

Tabella 6: dati relativi al segnalamento, alla sede biotica, all'aspetto macroscopico di tutte le biopsie, in grassetto i campioni risultati positivi

N°	Razza	S	Età	Sede biopsia	Aspetto macroscopico
1	CE	MC	1	Addome, piatto coscia	Lesione ulcerata e rilevata
2	CE	M	4m	Piatto coscia	Lesione ulcerata, rilevata, eritematosa
3	CE	M	6m	Piatto coscia	Lesione ulcerata, rilevata, lineare
4	CE	FS	1	Addome, inguine	Lesione lineare rilevata, ulcerata
5	CE	F	1,6	Loggia poplitea	Lesione ulcerata e rilevata
6	CE	F	1,6	Loggia poplitea	Lesione ulcerata e rilevata
7	CE	FS	1	Coscia	Area irregolare rilevata, eritematosa ulcerata in parte
8	Siamese	F	5	Coscia	Placche rilevate eritematose/ulcerate
9	CE	FS	5	Addome, piatto coscia	Aree ulcerate lineari
10	Norvegese	F	6m	Coscia posteriore monolaterale	Lesione nodulare eritematosa lineare
11	CE	MC	1	Inguine	lineare eritematosa
12	Abissino	FS	3	Faccia interna coscia	Lesione eritematosa, alopecica, lineare
13	CE	MC	5	Spalla	Lesione lineare eritematosa e pruriginosa
14	CE	M	10	Faccia interna coscia	Lesione lineare, erosiva
15	CE	M	7m	Regione collo e parte posteriore coscia	Lesione lineare eritematosa
16	CE	FS	>8	Coscia interna e collo	Lesione lineare papulo/crostosa
N°	Razza	S	Età	Sede biopsia	Aspetto macroscopico
17	CE	M	2	Cosce	Placche ovali, rilevate, eritematose alopeciche
18	CE	M	5	Addome, arti posteriori	Lesioni ulcerative eritematose
19	CE	FS	1	Coscia parte posteriore	Lesioni pruriginose, lineari, bilaterali, ispessite, irregolari, eritematose, squamose
20	Siamese	MC	1,6m	Interno coscia	Lesione lineare escoriata, pruriginosa
21	CE	F	3	Regione inguinale	Lesione lineare, essudativa, eritematosa, ispessita
22	CE	M	2	Regione laterale torace, interno arti anteriori	Aree alopeciche, eritematose

Tabella 7: descrizione istologica di tutte le biopsie, in grassetto i campioni risultati positivi

N°	Reperti istologici
1	Epidermide iperplastica con flogosi neutrofilica ed eosinofilica. Flogosi dermica interstiziale linfocitica ed eosinofilica con degenerazione del collagene. Infiltrazione linfocitica subintimale
2	Focale erosione ed ulcerazione dell'epidermide. Flogosi dermica interstiziale con linfociti, eosinofili e mastociti. Si riscontrano figure a fiamma.
3	Focale erosione ed ulcerazione dell'epidermide. Flogosi dermica interstiziale con linfociti, eosinofili e mastociti e degenerazione del collagene
4	Epidermide iperplastica con croste sierocellulari. Derma con infiltrato infiammatorio ad impronta istiocitaria, eosinofilica, zone a fiamma.
5	Dermatite multifocale granulomatosa cronica moderata
6	Dermatite multifocale granulomatosa cronica moderata
7	Focale erosione ed ulcerazione dell'epidermide. Flogosi dermica interstiziale con eosinofili e mastociti
8	Epidermide iperplastica con flogosi neutrofilica ed eosinofilica. Flogosi dermica interstiziale linfocitica ed eosinofilica con degenerazione del collagene.
9	Epidermide iperplastica con flogosi neutrofilica ed eosinofilica. Flogosi dermica interstiziale diffusa eosinofilica e mastocitaria, aree di degenerazione collagene.
10	Epidermide iperplastica con croste sierocellulari. Derma con infiltrato infiammatorio ad impronta istiocitaria, eosinofilica, zone a fiamma.
11	Epidermide iperplastica con croste sierocellulari. Flogosi dermica interstiziale diffusa eosinofilica e mastocitaria.
12	Epidermide iperplastica con spongiosi. Edema del derma superficiale e flogosi interstiziale linfocitaria ed eosinofilica.
13	Epidermide iperplastica con aree di erosione. Flogosi dermica interstiziale diffusa eosinofilica e mastocitaria.
14	Epidermide iperplastica con croste sierocellulari. Flogosi dermica interstiziale diffusa mista.
15	Epidermide iperplastica. Flogosi interstiziale diffusa ad impronta eosinofilica.
16	Epidermide moderatamente iperplastica. Derma con flogosi mista perivascolare,

	figure a fiamma.
17	Epidermide iperplastica, ulcerata con essudato fibrino-granulocitario. Derma con flogosi interstiziale diffusa mista, reattiva e foci di degenerazione collagenolitica.
18	Epidermide ulcerata con segni di degenerazione mucinosa. Derma con flogosi interstiziale diffusa e aree di collagenolisi.
19	Epidermide iperplastica, ulcerata con acantosi. Derma con flogosi interstiziale diffusa mista, figure a fiamma.
20	Epidermide iperplastica, ulcerata. Derma con flogosi interstiziale diffusa mista e degenerazione collagenolitica.
21	Epidermide ulcerata con croste fibrino-granulocitarie. Derma con flogosi interstiziale diffusa mista e collagene degenerato.
22	Flogosi interstiziale diffusa mista, degenerazione collagene.

3.11 Discussione

Per quanto riguarda i dati di segnalamento e clinici relativi ai gatti con lesione macroscopica correlabile a complesso del granuloma eosinofilo inseriti in questo lavoro, la nostra casistica ha mostrato risultati sovrapponibili a quelli pubblicati nella letteratura (Mason KV *et al.*, 1998; Rosenkrantz SW, 1993; Scott *et al.*, 2000).

L'età media dei gatti era di 2,7 anni con un range di 4 mesi e 10 anni, la maggior parte dei soggetti avevano un'età compresa tra 1 e 5 anni, età clinicamente caratteristica per la manifestazione delle problematiche correlabili al complesso del granuloma eosinofilo nel gatto. La distribuzione, in accordo con quanto riportato in letteratura (Gross TL *et al.*, 2005), era riferita all'addome e alle cosce con caratteristico andamento lineare e/o serpiginoso delle lesioni macroscopiche.

Nel nostro studio abbiamo incontrato una notevole difficoltà nel reperire il materiale biotico per la scarsa abitudine di effettuare il campionamento di questo tipo di lesioni macroscopiche che vengono, nelle maggior parte dei casi, classificate e gestite clinicamente come correlabili a malattie su base allergica e sottoposte a biopsia solo in caso di aspetto e/o distribuzione anomala, recidive frequenti, cronicizzazione e non risposta alla terapia (Scott DW, 2001).

L'aspetto istopatologico delle biopsie analizzate era compatibile con il quadro istopatologico descritto in letteratura caratterizzato da epidermide moderatamente acantotica, erosa, ulcerata e con essudazione neutro-linfocitica. Il derma si presentava infiammato con estesi foci di degranulazione eosinofila concentrata intorno a fibre collagene (caratteristiche "figure a fiamma").

A ridosso dei foci di degranulazione eosinofila si potevano isolare fibre collagene degenerate, o figure a fiamma, caratterizzate da un'area centrale intensamente eosinofila, rispetto alla normale colorazione bluastra. Il derma mostrava un infiltrato infiammatorio caratterizzato da eosinofili, macrofagi, mastociti e rari linfociti con edema e mucina in alcuni campioni. Nelle lesioni croniche la popolazione eosinofila non era predominante mentre un discreto numero di macrofagi e cellule giganti si concentravano intorno a foci di collagene e/o intorno a singole fibre collagene degenerate.

In 16 dei campioni analizzati l'aspetto istopatologico e la realizzazione dell'immunoistochimica hanno permesso di evidenziare l'organizzazione del

granuloma intorno ai vasi linfatici con conseguente vasculite spesso sospettata come linfangite.

In base a questi risultati l'organizzazione del processo infiammatorio intorno ai vasi e a livello subintimale con il successivo richiamo di cellule infiammatorie dal derma circostante e la degranolazione eosinofila conseguente ha permesso di comprendere l'andamento lineare delle lesioni macroscopiche che sembra seguire le strutture vasali.

Bibliografia per tutti i capitoli

1. Andrew SE: Ocular manifestations of feline herpesvirus. *Journal Feline Medical Surgery* 3: 9-16, 2001.
2. Andrew SE: Immune- mediated canine and feline keratitis. *Veterinary Clinics of North American Small Animal Practice* 38 (2): 269-290, 2008.
3. Allgoewer I, Schaffer EH, Stockaus C, et al: Feline eosinophilic conjunctivitis. *Veterinary Ophthalmology* 4: 69-74, 2001.
4. Baldrias L, Frost AJ, O'Boyle D: The isolation of *Pasteurella-like* organism from the tonsillar region of dogs and cats. *Journal of Small Animal Practice* 29: 63-68; 1998.
5. Bardagi M, Fondati A, Fondevilla D, Ferrer L: Ultrastructural study of cutaneous lesions in feline eosinophilic granuloma complex. *Veterinary Dermatology* 14: 297-303; 2003.
6. Binns SH, Dawson S, Stilles AJ et al: A study of feline upper respiratory tract disease with reference to prevalence and risk factors for infection with feline calicivirus and feline herpesvirus. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 2: 123-133, 2000.
7. Bittle JL, Peckham JA: Genital infection by feline rhinotracheitis virus and effects on newborn kittens. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 158 (2): 927-928, 1971.
8. Bistner SI, Shively JN, Scott FW: Ocular manifestations of feline herpesvirus infection. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 159; (10): 1223-1237, 1971.
9. Bodle JE: Feline herpesvirus infection. *Surv Ophthalmology* 21: 209-215, 1976.
10. Burgesser KM, Hotaling S, Schiebel A, et al: Comparison of PCR, virus isolation, and indirect fluorescent antibody, staining in the detection of naturally occurring feline herpesvirus infections. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation* 11: 122-126, 1999.
11. Cullen CL, Wadowska DW, Singh A et al: Ultrastructural findings in feline corneal sequestra. *Veterinary Ophthalmology* 8: 295-303, 2005.
12. Davison AJ, Seberle R, Hayward GS, et all: Herpesviridae. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, et all (Eds): *Virus Taxonomy: Eight report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Ed. Elsevier, San Diego, 2005, pp. 193-212.

13. Dawson S, McArdle F, Bennet M, Carter M, Milton JP, Turner P, Meanger J, Gaskell RM: Typing of Feline calicivirus isolates from different clinical groups by virus neutralisation tests. *The Veterinary Record* 133: 13-17; 1993.
14. Dawson DA, Carman J, Collins J et al: Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of feline herpesvirus 1 IgG in serum, aqueous humor, and cerebrospinal fluid. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 10: 315-319, 1998.
15. Diehl K: Feline gingivitis-stomatitis-pharyngitis. *Veterinary Clinics of North America-Small Animal Practice* 23: 139-153, 1993.
16. Donaldson AI, Ferris NP: The survival of some air-borne animal viruses in relation to relative humidity. *Veterinary Microbiology* 1: 413-420, 1976.
17. Eleraky NZ, Potgieter LN, Kennedy MA: Virucidal efficacy of four new disinfectants. *Journal of American Animal Hospital Association* 38: 231-234, 2002.
18. English RV, Nelson P, Johnson CM, Nassise M, Tompkins WA, Tompkins MB: Development of Clinical Disease in Cats Experimentally Infected with Feline Immunodeficiency Virus. *The Journal of Infectious Disease* 170: 543-552; 1994.
19. Fernandez CJ., Scott DW., Erb HN, Staining abnormalities of dermal collagen in eosinophil- or neutrophil-rich inflammatory dermatoses of horses and cats as demonstrated with Masson's trichrome stain. *Veterinary Dermatology* 11; 43-48; 2000.
20. Fitzpatrick's Dermatology in general medicine. Ed. Mc Graw Hill Vol. 1; 959-962, 2003.
21. Flecknell PA, Orr CM, Wright AL, et al: Skin ulceration associated with herpesvirus infection in cats. *Veterinary Record* 104: 313-315, 1979.
22. Fondati A., Fondevilla D., Ferrer L., Histopathological study of feline eosinophilic dermatoses. *Veterinary Dermatology* 12: 333-338, 2001.
23. Fondati A., Feline eosinophilic skin diseases. *Proceedings of the 18^o ESVD/ECVD annual congress*, 135-139; 2002.
24. Gaskell RM, Povey RC: Feline viral rinotracheitis: sites of virus replication and persistence in acutely and persistently infected cats. *Rescue Veterinary Science* 27: 167-174, 1979.
25. Gaskell RM, Povey RC: Trasmision of feline viral rhinotracheitis. *Veterinary Record* 111: 359-62, 1982.

26. Gaskell R, Dawson S, Radford A: Feline respiratory disease. In: Infection disease of the dog and cat, Greene C.E. Ed. WB Saunders, Missouri, 2006, pp.145-154.
27. Gaskell R, Dawson S, Radford A, et al: Feline herpesvirus. *Veterinary Research* 38 (2): 337-54, 2007.
28. Gutzwiller ME, Brachelente C, Taglinger K, et al: Feline herpes dermatitis treated with interferon omega. *Veterinary Dermatology* 18 (1): 50-54, 2007.
29. Gross TL, Ihrke PJ, Walder EJ, Affolter VK: Ulcerative and crusting disease of the epidermis. In: Gross TL, Ihrke PJ, Walder EJ, Affolter VK eds. Skin diseases of the dog and cat. Clinical and histopathologic diagnosis. Ed. Blackwell Science. 2005; pp. 116-135.
30. Gross TL, Ihrke PJ, Walder EJ, Affolter VK: Feline eosinophilic granuloma. In: Gross TL, Ihrke PJ, Walder EJ, Affolter VK eds. Skin diseases of the dog and cat. Clinical and histopathologic diagnosis. Ed. Blackwell Science. 2005; pp. 355-358.
31. Haid C, Kaps S, Gönczi E, et al: Pretreatment with feline interferon omega and the course of subsequent infection with feline herpesvirus in cats. *Veterinary Ophthalmology* 10 (5): 278-284, 2007.
32. Hagewald S, Bernimoulin JP, Kottegen E, et al.: Total IgA and Porphyromonas gingivalis-reactive IgA in the saliva of patients with generalised early-onset periodontitis. *European Journal of Oral Science* 108: 147-153, 2000.
33. Hara M, Fukuyama M, Suzuki Y, et al: Detection of feline herpesvirus 1 DNA by the nested polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology* 48 (3-4): 345-352, 1996.
34. Harbour DA, Howard PE, Gaskel RM: Isolation of feline calicivirus and feline Herpesvirus from domestic cats 1980 to 1989. *The Veterinary Record* 128: 77-80, 1991.
35. Harder TC, Harder M, Vos H et al: Characterization of phocid herpesvirus-1 and -2 as putative alpha- and gammaherpesvirus of North American and European pinnipeds. *Journal of General Virology* 77: 27-35, 1996.
36. Hargis AM, Ginn PE: Feline herpesvirus 1- associated facial and nasal dermatitis and stomatitis in domestic cats. *Veterinary Clinics of North American Small Animal Practice* 29: 1281-1290, 1999.

37. Hargis AM, Ginn PE, Mansell JE: Ulcerative facial and nasal dermatitis and stomatitis in cats associated with feline herpesvirus 1. *Veterinary Dermatology* 10: 267-274, 1999.
38. Harley R, Helps CR, Harbour DA, Gruffydd-Jones TJ, Day MJ: Cytokine mRNA Expression in lesions in Cats with Chronic Gingivostomatitis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 6(4): 471-478, 1997.
39. Harley R, Gruffydd-Jones TJ, Day MJ: Salivary and serum immunoglobulin levels in cats with chronic gingivostomatitis. *The Veterinary Record* 152: 125-129, 2003.
40. Harvey CE: Oral inflammatory disease in cats. *Journal of American Animal Hospital Association* 27: 585-591, 1991.
41. Helps C, Reeves N, Egan K et al: Detection of Chlamydia felis and feline herpesvirus time PCR analysis. *Journal Clinical Microbiology* 41 (6): 2734-2736, 2003.
42. Helps CR, Lait P, Damhuis A et al: Factors associated with upper respiratory tract disease caused by feline herpesvirus, feline calicivirus, Chlamydia felis and Bordetella bronchiseptica in cats: experience from 218 European catteries. *Veterinary Record* 159 (21): 669-673, 2005.
43. Holland JL, Outerbridge CA, Affolter VK: Detection of feline herpesvirus 1 DNA in skin biopsy specimens from cats with or without dermatitis. *Journal of American Veterinary Medical Association* 9: 1442-1446, 2006.
44. Hoover EA, Rohovsky MW, Griesemer RA: Experimental feline viral rhinotracheitis in the germfree cat. *American Journal of Pathology* 58: 269-282, 1970.
45. Hosie MJ, Robertson C, Jarret O: Prevalence of feline leukemia virus and antibodies to feline immunodeficiency virus in cats in the United Kingdom. *The Veterinary Record*, 128: 293-297, 1989.
46. Hsu SM, Raine L, Franger H: Use of Avidine-Biotin-Peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase technique: comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedure. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 29: 577-580, 1981.
47. Hussein IT, Miguel RN, Tiley LS, et al: Substrate specificity and molecular modelling of the feline herpesvirus-1 thymidine kinase. *Archive of Virology* 153 (3): 495-505, 2008.
48. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) 2007: www.ictvonline.org.

49. Johnesse JS, Hurvitz AI: Feline plasma cell gingivitis-pharyngitis. *Journal of the American Animal Hospital Association* 19: 179-181, 1983.
50. Johnson RP, Sabine M: The isolation of herpesvirus from skin ulcers in domestic cats. *Veterinary Record* 89: 360-362, 1971.
51. Johnson RP, Povey RC: Vaccination against feline viral rhinotracheitis in kittens with maternally derived feline viral rhinotracheitis antibodies. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 186(2): 149-52, 1985.
52. Johnson LR, Maggs DJ: Feline herpesvirus type-1 transcription is associated with increased nasal cytokine gene transcription in cats. *Veterinary Microbiology* 108: 225-233, 2005.
53. Johnson LR, Foley JE, De Cock HE, *et al.* Assessment of infectious organism associated with chronic rhinosinusitis in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*; 15; 227: 579-85, 2005.
54. Junge RE, Miller RE, Boever WJ, *et al.* Persistent cutaneous ulcers associated with feline herpesvirus type 1 infection in a cheetah. *Journal of American Veterinary Medical Association* 198: 1057-1058, 1991.
55. Khanna KM, Lepisto AJ, Decman V, *et al.* Immune control of herpes simplex virus during latency. *Current Opinion in Immunology* 16: 463-9, 2004.
56. Knowles JO, Gaskell RM, Gaskell CJ, Harvey CE, Lutz H: Prevalence of feline calicivirus, feline leukemia virus and antibodies to FIV in cats with chronic stomatitis. *The Veterinary Record* 124: 336-338, 1989.
57. Knowles JO, Gaskell RM, Gaskell CJ, McArdle F, Dawson S, Carter SD: Studies on the role of feline calicivirus in chronic stomatitis in cats. *Veterinary Microbiology* 27: 205-219, 1991.
58. Kyriazidou A, Brown PJ, Lucke VM: Immunohistochemical staining of neoplastic and inflammatory plasma cell lesions in feline tissues. *Journal of Comparative Pathology* 100: 337-341, 1989.
59. Kruetz LC, Johnson RP, Seal BS: Phenotypic and genotypic variation of feline calicivirus during persistent infection of cats. *Veterinary Microbiology* 59: 229-236, 1998.
60. Lang A, Brien JD, Nikolich-Zugich J. Inflation and long-term maintenance of cd8 t cells responding to a latent herpesvirus depend upon establishment of latency and presence of viral antigens. *Journal of Immunology* 183: 8077-87, 2009.

61. Lebich M, Harder TC, Frey HR et al: Comparative immunological characterization of type-specific and conserved B-cell epitopes of pinniped, felid and canid herpesviruses. *Archive of Virology* 136: 335-347, 1994.
62. Lee M, Bosward KL, Norris JM: Immunohistological evaluation of feline herpesvirus-1 infection in feline eosinophilic dermatoses or stomatitis. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 2010; 12: 72–9.
63. Lyon KF: The differential diagnosis and treatment of gingivitis in the cat. *Problems in Veterinary Medicine* 2(1): 137-151, 1990.
64. Lommer MJ, Verstraete FMJ: Concurrent oral shedding of feline calicivirus and feline herpesvirus 1 in cats with chronic gingivostomatitis. *Oral Microbiology and Immunology* 18: 131-134, 2003.
65. Love DN, Johnson JL, Moore LVH: *Bacteriodes* species from the oral cavity and oral-associated disease in cats. *Veterinary Microbiology* 19: 275-283, 1989.
66. Maggs DJ, Lapin MR, Nasisse MP: Detection of feline herpesvirus-specific antibody and DNA in aqueous humor from cats with or without uveitis. *American Journal Veterinary Research* 60: 932-936, 1999.
67. Maggs DJ: Update on pathogenesis, diagnosis and treatment of feline herpesvirus type 1. *Clinical Technician Small Animal Practice* 20: 94-101, 2005.
68. Mallonee DH, Harvey CE, Venner ML, et al. : Bacteriology of periodontal disease in the cat. *Arch Oral Biology* 33: 677-683, 1988
69. Marsilio F, Di Martino B, Aguzzi et al: Duplex polymerase chain reaction assay to screen for Feline Herpesvirus-1 and *Chlamydomphila* spp in mucosal swabs from cats. *Veterinary Research Community* 28: 295-298, 2004.
70. Mason KV., Evans AG Feline eosinophilic granuloma: a further clinical manifestation and etiology. *Proceedings AAVD/ACVD* 1998
71. Mason KV, Evans AG Mosquito-bite caused eosinophilic dermatitis in cats. *AVMA* 198; 12: 2086-89, 1991.
72. Merchant SR. Diagnosis of feline skin diseases based on cutaneous reaction patterns. *Compendium Continuing Education Veterinary Practice* 16: 163-172; 1994.
73. Moser M, Burns CC, Boomer S, Overbaugh J: The Host Range and Interference Properties of two closely related Feline Leukemia Variants suggest that they use Distinct Receptors. *Journal of Virology* 242: 366-377, 1998.
74. Nasisse MP, Guy JS, Davidson MG et al: Experimental ocular herpesvirus infection in the cat. Sites of virus replication, clinical features and effects of

- corticosteroid administration. *Investigation Ophthalmology Vision Science* 30 (8): 1758-1768, 1989.
75. Nasisse MP, Guy JS, Stevens RV et al: Clinical and laboratory findings in chronic conjunctivitis in cats: 91 cases (1983-1991). *Journal of American Veterinary Medical Association* 203: 834-837, 1993.
76. Nasisse MP, Glover TL, Moore CP, et al: Detection of feline herpesvirus 1 DNA in corneas of cats with eosinophilic keratitis or corneal sequestration. *American Journal Veterinary Research* 59: 856-858, 1998.
77. Nasisse MP, Weigler BJ: The diagnosis of ocular herpes virus infection. *Veterinary Compendium Ophthalmology* 7: 44-51, 1997.
78. Parzefall B, Schmahl W, Fischer A, et al. Evidence of feline herpesvirus-1 DNA in the vestibular ganglion of domestic cats. *Veterinary Journal* 184: 371-2, 2010.
79. Pedersen NC: Feline herpesvirus type 1 (feline rhinotracheitis virus). Virus infections of carnivores. MJ Appel, Ed. Elsevier science publishers 227-237, 1987.
80. Pedersen NC, Satop JE, Foley AM: Common virus infections in cats, before and after being placed in shelters, with emphasis on Feline enteric Coronavirus. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 6: 83-88, 2004.
81. Pesavento PA, MacLachlan NJ, Dillard-Telm L, Grant CK, Hurley F: Pathologic, Immunohistochemical, and Electron Microscopic Findings in Naturally Occurring Virulent Systemic Feline Calicivirus Infection in Cats. *Veterinary Pathology* 41: 257-263, 2004.
82. Poulet H, Brunet S, Soulier M, Leroy V, Goutebroze S, Chappuis G: Comparison between acute and chronic stomatitis/gingivitis isolates of feline calicivirus : pathogenicity, antigenic profile and cross-neutralization studies. *Arch Virology* 145: 243-261, 2000.
83. Power HT, Ihrke PJ. Selected feline eosinophilic skin disease. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 25: 833-850; 1995.
84. Power HT, Granuloma in a family of Specific Pathogen Free Cats. *Proceedings AAVD/ACVD* 1990
85. Ramsey DT: Feline Chlamidia and Calicivirus Infections. *Veterinary Clinics of North America-Small Animal Practice* 30(5): 1015-1026, 2000.

86. Reubel GH, Ramos RA, Hickman MA, et al: Detection of active and latent feline herpesvirus 1 infection using polymerase chain reaction. *Archive of Virology* 132 (3-4): 409-20, 1993.
87. Reubel GH, Hoffman DE, Niel C, Pedersen NC: Acute and chronic faucitis of domestic cats. A feline calicivirus-induced disease. *Veterinary Clinics of North America-Small Animal practice* 39: 335-351, 1992.
88. Rochette J: Treating the inflamed mouth. *Proceedings of WSAVA 2000*.
89. Roizman B: Herpesviridae: definition, provisional nomenclature and taxonomy. *Intervirology* 16: 201-217, 1981
90. Rosenkrantz WS Feline eosinophilic granuloma complex. In: Current Veterinary Dermatology. The science and art of therapy. Griffin CE, Kwochka KW, Macdonald JM, Eds. Mosby-Year Book, 1993: 319- 324.
91. Rota PA, Maes RK: Homology between feline herpesvirus-1 and canine herpesvirus. *Archive of Virology* 115: 139-145, 1990.
92. Russel RG., Slattum MM, Abkowitz J, Filamentous Bacteria in oral Eosinophilic Granuloma of Cat. *Veterinary Pathology* 25: 249-254; 1988.
93. Sawtell NM, Poon DK, Tansky CS, *et al*. The latent herpes simplex virus type 1 genome copy number in individual neurons is virus strain specific and correlates with reactivation. *Journal of Virology* 72: 5343-52; 1998.
94. Scott DW, Miller WH, Griffin CE: Feline eosinophilic granuloma complex. In: Scott DW, Miller WH, Griffin CE Small Animal Dermatology Ed. Saunders. 2001; pp. 1148-1153.
95. Sims TJ, Moncla BJ, Page RC: Serum antibody response to antigens of oral Gram-negative bacteria in cats with plasma cell gingivitis-stomatitis. *Journal of Veterinary Research* 69: 877-882, 1990.
96. Smith ME, Crighton AJ, Chishlom DM, Mountain RE: Plasma cell mucositis: a review and case report. *Journal of Oral Pathology and Medicine* 28: 183-186, 1999.
97. Sykes JE: Feline upper respiratory tract pathogens: Herpesvirus-1 and calicivirus. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian* 23(2): 166-175, 2001.
98. Stiles J:Feline herpesvirus. *Clinical Technician Small Animal Practice* 18, 3: 178-185, 2003.

99. Suchy A, Baudes B, Gelbmann W, et al: Diagnosis of feline herpesvirus infection by immunohistochemistry, polymerase chain reaction, and in situ hybridization. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation* 12: 186-191, 2000.
100. Sussman MD, Maes RK, Kruger JM. Vaccination of cats for feline rhinotracheitis results in a quantitative reduction of virulent feline herpesvirus-1 latency load after challenge. *Virology*; 228: 379-82; 1997.
101. Tizard IR., *Veterinary Immunology an introduction* eight ed. Eds. Saunders, chap. 25, 333-338, 2009
102. Tenorio AP, Franti CE, Madewell BR, Pedersen NC: Chronic oral infection in cats and their relationship to persistent oral carriage of feline calicivirus, immunodeficiency, or leukemia virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 29: 1-14, 1991.
103. Thompson RL, Sawtell NM. Replication of herpes simplex virus type 1 within trigeminal ganglia is required for high frequency but not high viral genome copy number latency. *Journal of Virology* 74: 965-74; 2000.
104. Topley & Wilson's *Microbiology and Microbial infections*, 10th Ed. 2005; *Virology* 1; 25-26: 488-20
105. Truyen U, Geissler K, Hirschberger J: Tissue distribution of virus replication in cats experimentally infected with distinct feline calicivirus isolates. *Berlin Munch. Tierarz. Wschr.* 112: 355-358 1999.
106. Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, et al: *Virus Taxonomy, Seventh Report of the international Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, New York, 2000.
107. Veir JK, Lappin MR, Foley JE et al: Feline inflammatory polyps: historical, clinical and PCR findings for feline calicivirus and feline herpesvirus-1 in 28 cases. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 4: 195-199, 2002.
108. Vogtlin A, Fraefel C, Albini S et al: Quantification of feline herpesvirus 1 DNA in ocular fluid samples of clinically diseased cats by real-time TaqMan PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 40(2): 519-523, 2002.
109. Volopich S, Benetka V, Schwendenwein I et al: Cytologic findings, and feline herpesvirus DNA and *Chlamydomyces felis* antigen detection rates in normal cats and cats with conjunctival and corneal lesions. *Veterinary Ophthalmology* 8, 1: 25-32, 2005.

110. Weigler BJ, Babineau CA, Sherry B, et al: High sensitivity polymerase chain reaction assay for active and latent feline herpesvirus-1 infections in domestic cats. *Veterinary Record* 140: 335-338, 1997.
111. Werner JA, Woo JC, Vernau W, Graham PS, Grahn RA, Lyons LA, Moore PF: Characterization of Feline Immunoglobulin Heavy Chain Variable Region Genes for The Molecular Diagnosis of B-cell Neoplasia. *Veterinary Pathology* 42: 596-607, 2005.
112. Westermeyer HD, Thomas SM, Kado-Fong H, et al: Assessment of viraemia associated with experimental primary feline herpesvirus infection or presumed herpetic recrudescence in cats. *American Journal Veterinary Research* 70 (1): 99-104, 2009.
113. White SD, Rosychuck RAW, Janik TA, Denerolle P, Schultheiss P: Plasma cell stomatitis-pharyngitis in cats: 40 cases (1973-1991). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 200(9): 1377-1380, 1992.
114. Wildy P: History and classification. In: *The Herpesviruses*. Ed. AS Kaplan, New York, Ac Press, 1973.
115. Williams CA, Aller MS: Gingivitis/stomatitis in cats. *Veterinary Clinics of North America-Small Animal practice* 22(6): 213-220, 1992.
116. Wisselink MA., van Ree R., Willemsse T Evaluation of Felis domesticus allergen 1 as a possible autoallergen in cats with eosinophilic granuloma complex. *American Journal of Veterinary Research* 63: 338-341, 2001.
117. Willoughby K, Bennett M, Mc Cracken CM et al: Molecular phylogenetic analysis of felid herpesvirus 1. *Veterinary Microbiology* 69: 93-97, 1999.
118. Yamamoto JK, Sparger E, Ho EW, Andersen PR, O'Connor TP, Mandell CP, Lowenstine L, Munn R, Pedersen NC: Pathogenesis of experimentally induced feline immunodeficiency virus infection in cats. *American Journal of Veterinary Research* 48: 1246-1258, 1988.
119. Yamamoto Jk, Hansen H, Ho EW, Morishita TY, Okuda T, Sawa TR, Nakamura RM and Pedersen NC: Epidemiologic and clinical aspect of feline immunodeficiency virus infection in cats from the continental United States and Canada and possible mode of transmission. *Journal of American Veterinary Medical Association* 194: 213-220, 1989.
120. Zanella A: Classificazione dei virus animali. In: Giorgio Poli *Microbiologia e Immunologia*. Ed. UTET, 372-373; 1991.

Pubblicazioni relative al dottorato

- 1- P. Persico, A. Vercelli, G. Zampilinini, L. Corneigliani; Veterinary Dermatology Scientific abstracts of the six World Congress of Veterinary Dermatology “PCR detection of feline herpes virus -1 in skin specimens from cats with facial ulcerative eosinophilic dermatitis” Vol 19, supplement 1; November 2008; 53.
- 2- Paola Persico, Paola Roccabianca, Antonella Vercelli, Luisa Corneigliani Veterinaria (Science Citation Index Expanded, Journal Citation Reports and CAB Abstracts) “Le infezioni cutanee da herpesvirus nel gatto: aspetti patogenetici, manifestazioni cliniche e metodiche diagnostiche”. Anno 23, numero 3, giugno 2009 pp. 25-31.
- 3- Paola Persico, Paola Roccabianca, Antonio Corona, Antonella Vercelli and Luisa Corneigliani. Veterinary Dermatology “Detection of feline herpes virus 1 via polymerase chain reaction and immunohistochemistry in cats with ulcerative facial dermatitis, eosinophilic granuloma complex reaction patterns and mosquito bite hypersensitivity” DOI: 10.1111/j.1365-3164.2011.00984.x Giugno 2011. On line.

Relazioni relative al dottorato

1. P. Persico, L. Corneigliani, A. Vercelli, G. Zampillinini. Free Comunication 59: PCR detection of feline herpes virus-1 in skin specimens from cats with facial ulcerative eosinophilic dermatitis. 6th World Congress of Veterinary Dermatology. 19-22 Novembre 2008. Hong Kong, China.
2. P. Persico, P. Roccabianca, A. Vercelli, L. Corneigliani. Comunicazione breve: Uso di PCR, istopatologia e immunoistochimica per la ricerca di FHV-1 in biopsie cutanee. 62° SCIVAC, 29-31 Maggio Rimini, Italia.
3. P. Persico, P. Roccabianca, A. Vercelli, L. Corneigliani. Relatore invitato: Diagnosi e terapia di FHV-1 nella specie felina. Corso PerFormat, Parma, 13 Dicembre 2009.

Altre pubblicazioni e relazioni nazionali ed internazionali non strettamente relative all'argomento del dottorato ma realizzate nel triennio 2008-2010

1. Stefano Toma, Silvia Colombo, Luisa Cornegliani, Paola Persico, Mario Galazerano, Maria Michela Gianino, Chiara Noli. Journal of Small Animal Practice "Efficacy and tolerability of once daily cephalexin in canine superficial pyoderma: a randomised controlled study". Vol 49, August 2008, pp. 384-391
2. Luisa Cornegliani, Paola Persico, Silvia Colombo. Veterinary Dermatology "Canine nodular dermatophytosis (kerion): 23 cases" Vol. 20; Number 3; June 2009; 185-190
3. Paola Persico, Diego Gatti, Luisa Cornegliani. Praxis Veterinaria "Effetto insetticida e repellente di piretroidi nei confronti di flebotomi: confronto tra diverse formulazioni" Volume XXX, n.°2- Giugno 2009, pp. 18-23
4. Giovanni Ghibardo, Chiara Noli, Paola Persico. Summa "Studio retrospettivo di 800 test intradermici allergometrici in cani con dermatite atopica in diverse regioni italiane" Volume 9, Novembre 2009, pp.29-31
5. C. Noli, S. Colombo, L. Cornegliani, G. Ghibardo, P. Persico, A. Vercelli, M. Galzerano. Veterinary Dermatology Scientific abstracts of the North American Veterinary Dermatology Forum "Quality of life for dogs with dermatological disease and for their owners. Part 2: evaluation of quality of life of dogs with various dermatological diseases and their owners and its correlation to efficacy of therapy", Vol 21, Number 3, June 2010; 321.
6. Chiara Noli, Silvia Colombo, Luisa Cornegliani, Giovanni Ghibardo, Paola Persico, Antonella Vercelli and Mario Galzerano. Veterinary Dermatology "Quality of life of dogs with skin disease and of their owners. Part 2: administration of a questionnaire in various skin diseases and correlation to efficacy of therapy" E-Pub. DOI: 10.1111/j.1365-3164.2011.00956.x