SOCIETÀ ITALIANA DELLE SCIENZE VETERINARIE
FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE E ZOOTECNICHE - BRESCIA

Nuove frontiere della diagnostica nelle scienze veterinarie

a cura di Giorgio Poli e Flaminio Addis

Atti del Seminario di Milano, 14 aprile 1989 e di Rende (CS), 6 maggio 1989

La S.I.S.Vet. ringrazia:

AIVPA - Associazione Italiana Veterinari Piccoli Animali
SCIVAC - Società Culturale Italiana Veterinari Animali da Compagnia
per il contributo alla pubblicazione degli Atti del Seminario.

SOCIETÀ ITALIANA
DELLE SCIENZE
VETERINARIE

FONDAZIONE INIZIATIVE
ZOOPROFILATTICHE
E ZOOTECNICHE - BRESCIA

Nuove frontiere della diagnostica nelle scienze veterinarie

a cura di Giorgio Poli e Flaminio Addis

Atti del Seminario di Milano, 14 aprile 1989 e di Rende (CS), 6 maggio 1989

La presente pubblicazione è stata realizzata
nell'ambito delle iniziative culturali della S.I.S.Vet.
(Società Italiana delle Scienze Veterinarie)
che ha organizzato il Seminario

© 1989 Malagoli Grafiche

Edito da SUMMA, rivista trimestrale per il Medico Veterinario - Milano aprile 1989

INDICE

pag.

ROLLO F.
Sonde geniche: principi e applicazioni 3

GAUDI S., AGRESTI A., MENEVERI R., PACCIARINI M., BONIZZI L., POLI G., GINELLI E.
Potenzialità delle sonde molecolari per la diagnosi di infezioni virali nel settore zootecnico-veterinario 11

DE SIMONE F., BROCCHI E.
Potenzialità dell'impiego di anticorpi monoclonali nella diagnostica virologica 17

SCANZIANI E., ROVETTA G., GAGNONE G.
Attualità sulle tecniche bioptiche isto-citologiche in patologia veterinaria 27

CASTAGNARO M.
Nuove metodiche diagnostiche in anatomia patologica veterinaria 43

GUALTIERI M., ADDIS F., MORTELLARO C.A., FONDA D., ROMUSSI S.
Importanza della fibroscopia nella diagnosi delle neoplasie dell'apparato gastroenterico del cane 63

GALANTE Y.M.
Metodi rapidi immunoenzimatici per il dosaggio di contaminanti chimici e biologici negli animali e prodotti da essi derivati 73

FEDRIGO M.
Proposte applicative dell'ecografia nei piccoli animali ... 99

FERRO E., BRAMBILLA P.G.
L'esame ecografico del torace del cavallo 111

FERRO E., BRAMBILLA P.G.
Esame ecocardiografico nel cane 121

LORIZIO R., BRUNETTI A.
La Medicina Nucleare, la Tomografia Assiale Computerizzata e la Risonanza Magnetica Nucleare: possibilità di impiego in medicina veterinaria 131

Rollo F.
Dipartimento di Biologia Cellulare - Università di Camerino

Sonde geniche: principi e applicazioni

Generalità

Il materiale genetico di quasi tutti gli organismi a noi noti, fanno eccezione alcuni virus, è il DNA, una molecola composta da due filamenti disposti in una struttura a doppia elica, ciascuno dei quali costituito da una sequenza di quattro tipi di unità chimiche, i nucleotidi.

I nucleotidi presenti su di un filamento interagiscono con quelli dell'altro, tramite la formazione di legami idrogeno, secondo precise regole di appaiamento svelate per la prima volta trent'anni or sono da Watson e Crick.

I legami idrogeno che si formano tra nucleotidi complementari rendono stabili la struttura della molecola.

Tuttavia, ad una temperatura sufficientemente alta, l'energia cinetica media delle molecole può rompere tali legami, portando alla separazione dei due filamenti (denaturazione). Questi poi possono riformare la struttura a doppio filamento allorché la temperatura scende al disotto di un certo valore (rinaturazione).

Questa reversibilità di interazione tra due filamenti complementari di DNA, che segue una cinetica di secondo ordine, è sfruttata nelle tecniche di analisi basate sull'ibridazione molecolare.

Quest'ultima può essere definita una reazione di riassociazione tra molecole di acidi nucleici a singolo filamento che mostrino nella loro sequenza nucleotidica un sufficiente grado di complementarietà.

I parametri che influenzano il fenomeno della ibridazione molecolare sono la forza ionica del mezzo, la lunghezza dei filamenti del DNA, la loro composizione in basi, il numero di basi non complementari e la temperatura.

Quando si ibridano tra loro filamenti di DNA a diverso grado di complementarietà, sono questi parametri a determinare quali tipi di molecole a doppio filamento saranno stabili.

A parità di altre condizioni, ad una temperatura sufficientemente bassa, si potranno formare doppi filamenti anche fra catene non perfettamente complementari. Aumentando gradualmente la temperatura, si raggiungerà un valore tale da permettere l'esistenza solamente di doppi filamenti perfettamente appaiati.

Il principio su cui si basano le sonde geniche è proprio quello della specificità di interazione tra catene complementari di acidi nucleici (DNA o RNA).

Una sonda genica consiste in un frammento di DNA ottenuto normalmente per clonaggio di tratti del genoma di un organismo o per sintesi chimica, sulla base di una sequenza nucleotidica nota, marcato opportunamente con un isotopo radioattivo. La sonda genica è in grado di ibridare, e quindi di rivelare, in virtù della sopracitata specificità di interazione con la catena complementare,

la presenza di sequenze nucleotidiche omologhe in una popolazione anche molto complessa di acidi nucleici.

All'atto pratico, la reazione di ibridazione tra la sonda e la eventuale sequenza complementare può avvenire in soluzione o con la sequenza complementare fissata su di un supporto solido. Le tecniche di ibridazione su supporto solido (*Dot-blot, Southern-blot*) sono di gran lunga le più diffuse in quanto consentono allo sperimentatore di analizzare contemporaneamente anche decine di campioni con la medesima sonda.

Le sonde geniche permettono di analizzare in dettaglio l'organizzazione dei geni di genomi complessi, quale quello umano (3×10^9 coppie di basi), mettendo in evidenza polimorfismi dei frammenti di restrizione (RFLP).

Il settore principale di applicazione delle sonde clonate è, tutt'ora, quello della diagnosi delle malattie ereditarie nell'uomo, tramite l'analisi diretta del tratto di DNA responsabile della patologia, quando ciò è possibile, oppure attraverso l'analisi di siti polimorfici prossimi al gene mutato (in *linkage*). Questo tipo di diagnosi, fino a non molti anni fa, veniva formulato per via indiretta, basandosi cioé sulla rivelazione di prodotti genici anomali.

La disponibilità di sonde clonate di DNA umano ha reso possibile la rivelazione e la caratterizzazione di difetti genetici direttamente sul DNA.

Da alcuni anni a questa parte, inoltre, sonde geniche opportunamente selezionate, in funzione della loro sensibilità e selettività, vengono adoperate sempre più frequentemente per rivelare la presenza di agenti infettivi eucarioti, procarioti e virali nell'uomo, negli animali e nelle piante.

Infine, l'analisi del polimorfismo dei frammenti di restrizione del DNA, tramite le sonde geniche, si sta rivelando un potente strumento nella selezione genetica di animali e piante.

Il numero delle sonde geniche disponibili per la ricerca di base o applicata cresce di giorno in giorno come pure i settori di impiego.

Il bollettino bibliografico 'DNA *probes*' edito dall'Università di Sheffield, che da cinque anni a questa parte esce con due numeri al mese, cita, in ogni numero, circa ottanta voci bibliografiche riguardanti costruzione e applicazione di sonde geniche in settori della ricerca sull'uomo, animali, virus, batteri, funghi e piante.

La reazione a catena della polimerasi

In questi ultimi tempi si sta facendo strada una metodologia alternativa a quella della sonda clonata.

Questa metodologia, la reazione a catena della polimerasi (PCR, *polymerase chain reaction*), messa a punto negli anni scorsi da un gruppo di ricercatori del dipartimento di genetica umana della californiana Cetus Corporation, permette di verificare la presenza di una determinata sequenza nucleotidica nel DNA di un organismo, amplificando la sequenza selettivamente e con enorme efficienza.

Punto di partenza per la messa a punto di un sistema di PCR è la conoscenza della sequenza nucleotidica del tratto di DNA che vogliamo amplificare (sequenza bersaglio). È necessario poi sintetizzare due oligonucleotidi comple-

mentari alle estremità della sequenza bersaglio.

Gli oligonucleotidi sono orientati in modo da presentare le estremità 3'OH dirette l'una verso l'altra. La reazione di amplificazione si svolge nel modo seguente. In una provetta vengono messi una piccola quantità della preparazione di DNA nella quale si vuole verificare la presenza della sequenza bersaglio, i due oligonucleotidi, una miscela dei quattro nucleotidi trifosfati e una DNA polimerasi termostabile (Taq polimerasi). Riscaldando a circa 90 °C e poi raffreddando la provetta si produce la denaturazione del DNA e, qualora sia presente la sequenza bersaglio, l'ibridazione degli oligonucleotidi alle estremità di quest'ultima. A questo punto la polimerasi sintetizza nuovi filamenti di DNA partendo dalle estremità 3'OH degli oligonucleotidi. Ripetendo nuovamente il ciclo di denaturazione, ibridazione e sintesi si ottiene la produzione di nuovi filamenti di DNA, copie della sequenza bersaglio, secondo una progressione esponenziale. Una volta amplificata, la sequenza bersaglio può essere caratterizzata in diversi modi: mediante elettroforesi su agarosio, restrizione e ibridazione molecolare con oligonucleotidi sintetici.

È anche possibile determinare la sequenza nucleotidica del DNA amplificato, usando il metodo di Sanger, senza che sia necessario clonare il DNA amplificato (sequenziamento diretto).

La reazione a catena della polimerasi ha trovato numerose e importanti applicazioni, nella diagnosi di malattie ereditarie, in quella di alcune malattie infettive, nello studio degli oncogèni e nell'analisi della variabilità di sequenze alleliche.

Applicazioni particolari della reazione a catena della polimerasi riguardano la medicina legale e la neonata disciplina dell'archeologia molecolare.

In questi ultimi casi si sfrutta lo straordinario potere di amplificazione della PCR per isolare sequenze nucleotidiche specifiche da campioni di piccolissime dimensioni, come un singolo capello umano, o da campioni eccezionalmente vecchi come reperti umani o vegetali provenienti da scavi archeologici, contenenti il DNA degradato.

Identificazione di microorganismi mediante elettroforesi pulsata

Anche se questa metodologia non rientra nella definizione data inizialmente di sonda genica, mi pare opportuno darne qualche cenno per il notevole interesse di alcune sue applicazioni e poi in quanto si tratta comunque di una metodologia di riconoscimento basata sul DNA.

L'elettroforesi pulsata è una tecnica di separazione di frammenti di DNA di grandi dimensioni, che sfrutta l'eccezionale potere risolutore fornito da vasche elettroforetiche dotate di elettrodi disposti secondo particolari configurazioni e/o alimentati alternativamente secondo un opportuno programma.

L'applicazione dell'elettroforesi pulsata all'analisi del DNA dei bassi eucarioti (lieviti, protozoi, funghi) ha permesso di separare ed evidenziare i filamenti di DNA corrispondenti ai singoli cromosomi dei microorganismi. La comparazione dei profili elettroforetici dei DNA cromosiomali di microorganismi simili ha messo in evidenza, in molti casi, un notevole polimorfismo nel numero e nella distribuzione delle bande di DNA. Tale fenomeno può essere utiliz-

zato a fini diagnostici, per esempio per evidenziare ceppi differenti nell'ambito di microorganismi di una stessa specie.

Una metodologia simile è applicabile anche alla tipizzazione di microorganismi procarioti. È stato osservato, infatti, che digerendo il DNA di batteri del genere *Pseudomonas* con enzimi di restrizione che presentano siti di taglio infrequenti, come Dra o Not e separando i frammenti di restrizione con elettroforesi pulsata, si ottengono profili di bande che costituiscono vere e proprie impronte digitali del DNA, specifiche per i singoli isolati batterici.

Monitoraggio di microorganismi "ingegnerizzati"

Desidero concludere questa sintetica rassegna di alcuni aspetti della diagnostica molecolare basata sul DNA, con un breve cenno alla problematica emergente del monitoraggio dei microorganismi "ingegnerizzati".

Con questo termine, indichiamo microorganismi il cui corredo genetico sia stato modificato (aggiungendo, sostituendo, o sottraendo tratti di DNA) tramite operazioni di ingegneria genetica.

I microorganismi "ingegnerizzati" possono sfuggire accidentalmente dal laboratorio nel quale sono stati prodotti, oppure essere rilasciati volutamente nell'ambiente naturale per scopi biotecnologici. Un esempio famoso di quest'ultima situazione è il caso della costruzione di ceppi di *Pseudomonas syringae* e *P. fluorescens*, deleti di una porzione del gene responsabile della nucleazione del ghiaccio (gene INA) e del loro rilascio nell'ambiente naturale, perché agiscano come antagonisti dei batteri criogeni.

In tutti questi casi è necessario disporre di sonde molecolari per individuare con sicurezza il microorganismo ingegnerizzato in mezzo ad altri microorganismi, a lui simili, presenti nell'ambiente.

Questo specifico tipo di monitoraggio ha aspetti comuni al monitoraggio dei microorganismi patogeni come pure altri aspetti che sono peculiari di questo settore della ricerca applicata.

Di questi ultimi quello più originale è che con metodiche di ingegneria genetica è possibile inserire nel microorganismo sequenze specifiche di riconoscimento atte a renderlo distinguibile da ogni altro microorganismo della stessa specie presente in natura. Un esempio significativo di questa possibilità è l'inserzione di geni *lux* nel cromosoma di batteri del genere *Pseudomonas*, *Agrobacterium* e *Rhizobium* che acquisiscono così il carattere della bioluminescenza.

Attualmente è in fase di realizzazione un altro tipo di segnale di riconoscimento, frutto di una collaborazione tra l'Istituto di Genetica della Facoltà di Scienze dell'Università di Firenze ed il laboratorio dello scrivente, nell'ambito di un programma BAP- CEE per la valutazione del rischio biotecnologico.

Il segnale di riconoscimento è costituito da una sequenza di DNA a doppia elica della lunghezza di 85 nucleotidi ottenuta per ibridazione e ligazione di quattro oligonucleotidi sintetici. Tale sequenza, denominata "modulo di amplificazione", contiene alle estremità due corte sequenze cui possono legarsi, per ibridazione molecolare, altrettanti oligonucleotidi e, nella parte centrale, una sequenza più lunga dove, mediante un codice basato sulle triplette di nucleotidi, può essere inserita una scritta di riconoscimento (un nome, un indirizzo, u-

Figura 1 - **La prima pagina di un numero recente del bollettino bibliografico "DNA *Probes*".**

ISSN 0266-6308

UNIVERSITA' DEGLI ST
DI CAMERINO
Dipartimento di Biologia Cell
FISIOLOGIA
Cat. n. III
Inv. n. .....

DNA PROBES

Issued twice per month by

Sheffield University Biomedical Information Service

Postal address: SUBIS, University, Sheffield S10 2TN, England

Telephone: Sheffield (0742) 768555 ext 6232

Fax: Sheffield (0742) 739826

Telex: 547216 UGSHEF G (Quote 'SUBIS')

VOLUME 5 NUMBER 2 LATE JANUARY 1989

1. BOOKS, REVIEWS, SYMPOSIA
2. GENERAL
3. HUMANS
4. OTHER MAMMALS
5. OTHER ANIMALS
6. VIRUSES
7. BACTERIA
8. FUNGI
9. PLANTS
10. FINGERPRINTING
11. POLYMERASE CHAIN REACTION
12. FORTHCOMING EVENTS

1. BOOKS, REVIEWS, SYMPOSIA

Kahn A
M S-MED SCI 1988, 4 (8) 515
In vitro amplification of DNA fragments by polymerase chain reaction (PCR): a new deal in genetics (Minireview)

Warford A// Leicester Royal Infirm, Dept Pathol. Clin Sci Bldg, POB 65, Leicester LE2 7LX, England
MED LAB SCI 1988, 45 (4) 381
In situ hybridisation: a new tool in pathology (Review)

2. GENERAL

Gunteski-Hamblin A-M, Greeb J, Shull GE // Dept Microbiol & Molec Genet, Univ Cincinnati Coll Med, Cincinnati, Oh 45267, USA
J BIOL CHEM 1988, 263 (29) 15032
A novel Ca2+ pump expressed in brain, kidney, and stomach is encoded by an alternative transcript of the slow-twitch muscle sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase gene. Identification of cDNAs encoding Ca2+ and other cation-transporting ATPases using an oligonucleotide probe derived from the ATP-binding site.

Müller MA, Zoeller RT, Dorsa DM//VA Med Ctr, Geriatr Res Educ & Clin Ctr 182B, 1660 S Columbian Way, Seattle, Wa 98108, USA
NEUROSCI LETT 1988, 94 (3) 264
Detection of vasopressin messenger RNA in cells within the bed nucleus of the stria terminalis by in situ hybridization histochemistry.

Maxwell ES, Sarge KD// N Carolina State Univ, Dept Biochem, Box 7622, Raleigh, NC 27695, USA
BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN 1988, 157 (1) 154
A simple and rapid method for the preparation of homologous DNA oligonucleotide hybridization probes from heterologous gene sequences and probes.

Matsuba I, Lemmark A*, Madsen O, Michelsen B, Nielsen JH, Scholler J, Vissing H, Welinder B, Tommerup N, Mikkelsen M, Ishikawa H, Ikeda Y, Tanese T// *Univ Washington, Dept Med, RG-20, Seattle, Wa 98195, USA
IN VITRO CELL DEVELOP BIOL 1988, 24 (11) 1071
Gene probes to detect cross-culture contamination in hormone producing cells lines.

3. HUMANS

Takahashi H, Nukiwa T, Yoshimura K, Quick CD, States DJ, Holmes MD, Whang-Peng J, Knutsen T, Crystal RG*// *Pulm Branch, Bldg 10, Rm 6D03, NIH, Bethesda, Md 20892, USA
J BIOL CHEM 1988, 263 (29) 14739
Structure of the human neutrophil elastase gene.

Lytton J, MacLennan DH*// *Banting & Best Dept Med Res, CH Best Inst, Univ Toronto, Toronto, Ontario, Canada M5G 1L6
J BIOL CHEM 1988, 263 (29) 15024
Molecular cloning of cDNAs from human kidney coding for two alternatively spliced products of the cardiac Ca2+-ATPase gene.

Smithgall TE, Yu G, Glazer RI*// *Lab Biol Chem, Dev Therapeut Prog, Div Cancer Treat, Natl Cancer Inst, Natl Inst Hlth, Bethesda, Md 20892, USA
J BIOL CHEM 1988, 263 (29) 15050
Identification of the differentiation-associated p93 tyrosine protein kinase of HL-60 leukemia cells as the product of the human c-fes locus and its expression in myelomonocytic cells.

West JD, Gosden JR, Angell RR, West KM, Glasier AF, Thatcher SS, Baird DT// Univ Edinburgh, Ctr Reprod Biol, Dept Obstet & Gynaecol, 37 Chalmers St, Edinburgh EH3 9EW, Scotland
HUM REPROD 1988, 3 (8) 1010
Sexing whole human pre-embryos by in-situ hybridization with a Y-chromosome specific DNA probe.

Covone AE, Kozma R, Johnson PM, Latt SA, Adinolfi M// Childrens Hosp Boston, Div Genet, Boston, Ma 02115, USA
PRENATAL DIAG 1988, 8 (8) 591
Analysis of peripheral maternal blood samples for the presence of placenta-derived cells using Y-specific probes and McAb H315.

Schwartz M, Super M, Schmidtke J, Buys C, Farrall M, Halley D, Krawczak M, Poncin JE, Loukopoulos D, Devoto M// Univ Hosp Copenhagen, Rigshosp, Dept Pediat, Clin Genet Sect, Blegdamsvej 9, DK-2100 Copenhagen 0, Denmark
PRENATAL DIAG 1988, 8 (8) 619
Prenatal diagnosis of cystic fibrosis using linked DNA probes.

Carlson M, Nakamura Y, Krapcho K, Payson R, O'Connell P, Leppert M, Lathrop GM, Lalouel JM, White R// Univ Utah, Sch Med, Howard Hughes Med Inst, Salt Lake City, Ut 84112, USA
NUCL ACID RES 1988, 16 (22) 10941
Isolation and mapping of a polymorphic DNA sequence (pMCT149.2) on chromosome 15 [D15S34]

Fujimoto E, Nakamura Y, O'Connell P, Leppert M, Lathrop GM, Lalouel JM, White R// Univ Utah, Sch Med, Howard Hughes Med Inst, Salt Lake City, Ut 84132, USA
NUCL ACID RES 1988, 16 (22) 10942
Isolation and mapping of a polymorphic DNA sequence (pEFD52.1) on chromosome 15 [D15S44]

Fujimoto E, Nakamura Y, Ballard L, O'Connell P, Leppert M, Lathrop GM, Lalouel JM, White R// Univ Utah, Sch Med, Howard Hughes Med Inst, Salt Lake City, Ut 84132, USA

Figura 2 - **Impronte digitali del DNA di batteri ottenute mediante macrorestrizione del cromosoma batterico intatto utilizzando l'enzima di restrizione Not e successiva separazione dei frammenti di DNA con elettroforesi pulsata (FIGE). 1-7: ceppi diversi del batterio *Pseudomonas syringae*. Si può osservare come la distribuzione delle bande fluorescenti ottenute con questa particolare metodica differisca sensibilmente da ceppo a ceppo. Questo fenomeno può essere utilizzato ai fini della diagnostica.**

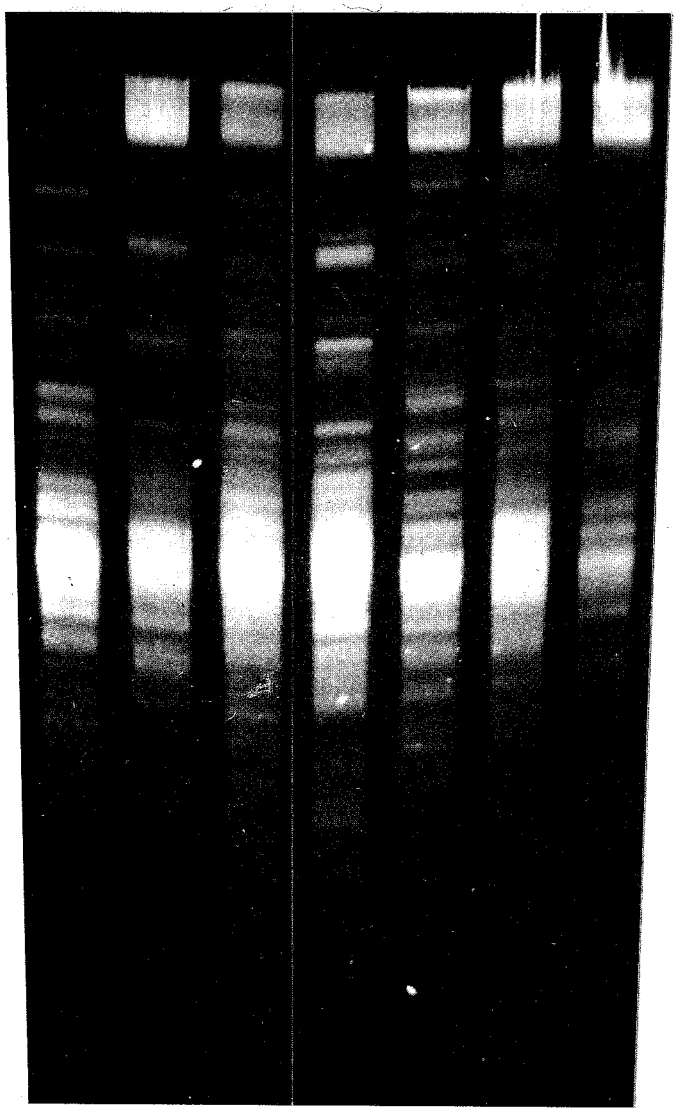
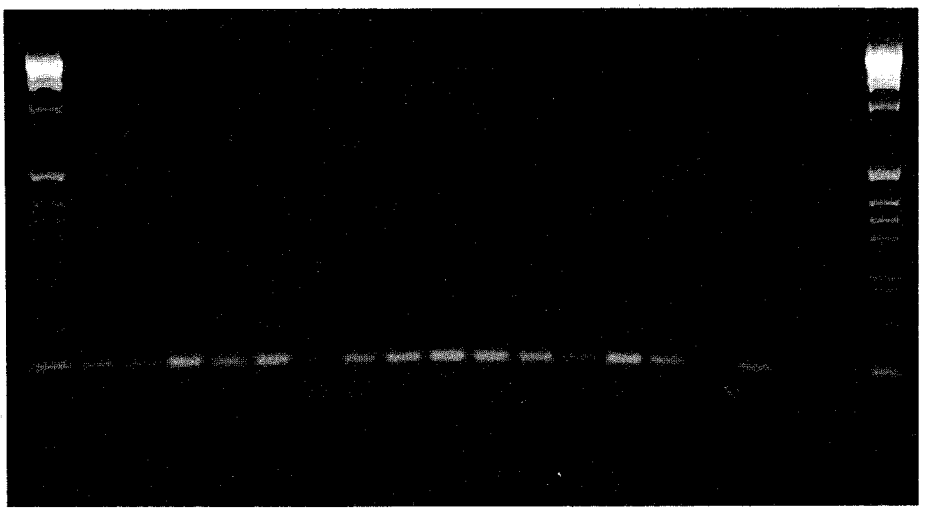


Figura3- **Riconoscimento diretto di isolati fungini mediante reazione a catena della polimerasi (PCR) e analisi elettroforetica del DNA amplificato. Il fungo viene identificato per la presenza nel suo DNA di una sequenza bersaglio specifica di 102 coppie di basi (bp). 1,20: standards molecolari; 2-17: isolati di *Phoma tracheiphila*; 18,19 funghi di specie diversa. Tutti gli isolati di *Phoma tracheiphila* producono caratteristiche bande di 102 bp (indicate dalla freccia). Da notare che il test di amplificazione è stato effettuato utilizzando 2 µl di omogenato grezzo di micelio, in altri termini, senza ricorrere alla purificazione del DNA cellulare del fungo.**



na sigla, ecc.). Il modulo può essere inserito nel cromosoma di un batterio Gram-negativo mediante un trasposone Tn5.

Una volta inserito nel batterio, il modulo funge da sequenza bersaglio per una reazione di amplificazione enzimatica mediante reazione a catena della polimerasi. Il DNA amplificato, a sua volta, può essere sottoposto ad una analisi diretta della sequenza nucleotidica. Si risale così alla scritta di riconoscimento.

BIBLIOGRAFIA

Una panoramica generale sui principi ed applicazioni delle sonde geniche è presentata in "Sonde molecolari: applicazioni di oggi e prospettive future". *Biotech*, numero speciale, Aprile 1988.

Per un elenco dettagliato delle sonde geniche attualmente disponibili si rimanda ai numeri del già citato "DNA *Probes*", SUBIS University, Sheffield S10 2TN, England.

Un articolo introduttivo alla reazione a catena della polimerasi (PCR) è quello di Erlich H.A., Gelfand D.H., Saiki R.K.: "Specific DNA amplification". *Nature 331*, 461 (1988).

Per l'applicazione dell'elettroforesi pulsata alla tipizzazione di microorganismi eucarioti citerò, a titolo di esempio, l'articolo di De Jonge P., De Jongh F.C.M., Meijers R., Yde Steensma H., Scheffers W.A.: "Orthogonal-field alternation gel electrophoresis banding patterns of DNA from yeasts". *Yeast 2*, 193-204 (1986).

Gaudi S., Agresti A., Meneveri R. (1) - Pacciarini M. (2) - Bonizzi L., Poli G. (3) - Ginelli E. (4)

(1) Dip. di Biologia e Genetica per le Scienze Mediche - Università di Milano
(2) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia - Brescia
(3) Istituto di Microbiologia ed Immunologia, Fac. Med. Veterinaria - Università di Milano
(4) Cattedra di Biologia Generale, Fac. Med. e Chir. - Università di Messina

Potenzialità delle sonde molecolari per la diagnosi di infezioni virali nel settore zootecnico-veterinario

Introduzione

Attualmente le infezioni virali possono essere diagnosticate mediante esami di laboratorio diretti ed indiretti.

I primi si basano sull'evidenziazione dell'agente infettante direttamente nei tessuti colpiti, oppure osservando l'effetto dell'inoculazione del campione patologico in uova embrionate di pollo o su monostrati cellulari *in vitro*.

I metodi indiretti mettono invece in evidenza la risposta anticorpale all'infezione o le caratteristiche antigeniche dell'agente patogeno; tra i più utilizzati possiamo citare il test di neutralizzazione, l'inibizione dell'emoagglutinazione, la fissazione del complemento, l'immunodiffusione su gel di agar, l'immunofluorescenza ed infine l' ELISA e il RIA.

È importante notare che i metodi citati non sempre sono soddisfacenti riguardo all'esigenza di ottenere risultati diagnostici non ambigui e ciò ha stimolato la messa a punto di metodi alternativi che rivelano l'infezione mettendo in evidenza il genoma dell'agente infettante.

Questa metodologia si basa sulla disponibilità, attraverso la tecnologia del DNA ricombinante, di **sonde molecolari** clonate (rappresentative di interi genomi virali o di singoli geni) e sull'ibridazione DNA/DNA o DNA/RNA.

La potenzialità della **diagnostica molecolare,** nel settore zootecnico-veterinario, è stata da noi valutata nelle infezioni causate dal virus erpetico bovino 1 (BHV-1) e da quello della leucosi bovina (BLV).

La diagnostica dell'infezione da BHV-1, agente eziologico della rinotracheite infettiva bovina, è problematica negli animali con infezione latente tipica dei virus erpetici, poiché il patogeno è presente nelle secrezioni nasali e nell'eiaculato in concentrazioni molto basse ma sufficienti per trasmettere l'infezione. Inoltre, il virus può essere escreto anche da animali vaccinati e da quelli che non presentano una risposta immunitaria.

Il materiale seminale, attraverso la fecondazione artificiale, rappresenta una importante via di trasmissione ed è quindi indispensabile disporre di un metodo diagnostico affidabile per il rivelamento del virus nello sperma bovino. I metodi attualmente disponibili (inoculazione su monostrati di colture cellulari *in vitro*, RIA ed ELISA) presentano inconvenienti dovuti alla scarsa sensibilità ed alla possibilità di ottenere risultati poco attendibili a causa della citotossicità del

seme e della eventuale presenza di attività neutralizzanti il virus.

Il BLV, un retrovirus di tipo C, è invece l'agente causale della leucosi enzootica bovina (LEB). L'integrazione di provirus BLV nel genoma dei linfociti bovini, dopo la comparsa di una risposta umorale verso gli antigeni strutturali, può indurre lo sviluppo di una linfocitosi persistente (LP) oppure di un tumore. Inoltre, il virus è correlato ai virus umani T-linfotropici (HTLV I e HTLV II) ed è in grado di infettare cellule umane *in vitro*, rappresentando così un pericolo potenziale per la salute dell'uomo.

Gli attuali sistemi diagnostici, basati sul rilievo di anticorpi contro la gp60 di BLV, non sono però affidabili in animali con infezioni latenti (falsi negativi) ed in bovini di età inferiore all'anno che possono risultare falsamente positivi per la presenza di anticorpi anti-BLV ricevuti passivamente dalla madre.

Materiale e Metodi

Prelievi e preparazione dei campioni

I campioni di seme bovino e gli estratti di trachea sono stati ottenuti da animali siero-positivi o siero-negativi per BHV-1. Il rilevamento di BHV-1 nel seme è stato effettuato mediante inoculazione su monostrato di cellule embrionali di rene bovino (BEK). Il seme bovino infettato sperimentalmente è stato ottenuto mescolando sospensioni titolate di BHV-1 con 0,2 ml di seme bovino, fino ad ottenere una concentrazione di particelle virali equivalente a 10^3 -10^6 ($TCID_{50}$)

Il seme infettato sperimentalmente ed i campioni di seme di animali siero-positivi e siero-negativi per BHV-1 sono stati quindi centrifugati a bassa velocità; gli acidi nucleici contenuti nel supernatante e nella frazione cellulare sono stati purificati mediante lisi con SDS-proteinasi K e deproteinizzazione con fenolo-cloroformio. Gli acidi nucleici sono stati purificati dagli estratti di trachea con lo stesso metodo.

Per la sperimentazione sul BLV, i prelievi di sangue sono stati effettuati ad intervalli di un mese, dalla nascita fino a 9 mesi di vita, su vitelli nati da madri siero-negative e siero-positive per anticorpi contro l'antigene gp60 di BLV e affette o meno da LP.

I campioni di sangue sono stati utilizzati per la determinazione della conta linfocitaria, della siero-positività per l'antigene gp60 di BLV ed infine per l'isolamento di linfociti su gradiente di Ficoll. Il DNA genomico bovino è stato estratto dai linfociti mediante il metodo SDS-proteinasi K (Maniatis *et al.*, 1982).

Sonde molecolari

Il plasmidio ricombinante pHV 2, con un inserto di 12,5 Kb rappresentativo di circa il 10% del genoma di BHV-1, è stato ottenuto per clonazione del DNA di BHV-1, digerito con l'enzima Hind III, nel vettore plasmidico pUC8 (Pacciarini *et al.*, 1988).

Il plasmidio ricombinante pBLV contiene un inserto di 8,3 Kb (circa il 90% dell'intero genoma virale) ed è stato ottenuto mediante clonazione nel sito PstI del vettore plasmidico pBR322 di un provirus integrato, isolato da un tumore

bovino (Deschamps *et al.*, 1981). Il plasmidio è stato gentilmente fornito dal Dr. Kettmann, Bruxelles.

Gel elettroforesi, Southern-blot *e* dot-blot

Il DNA genomico bovino, digerito con diversi enzimi di restrizione, è stato frazionato mediante elettroforesi in gel di agarosio e quindi trasferito su filtri di nitrocellulosa secondo la metodica descritta da Southern (1975). I *dot-blots* sono stati preparati come descritto da Kafatos *et al.* (1979).

Marcatura radioattiva delle sonde e ibridazione molecolare

Le sonde a DNA sono state marcate con ^{32}P-dCTP mediante la reazione di *nick-translation* (attività specifica 0,5-1x10^9 cpm/µg DNA).

I *Southern-* e i *dot-blots* sono stati ibridati come descritto precedentemente (Pacciarini *et al.*, 1988) in presenza della sonda radioattiva ed una concentrazione di 2-4x10^6 cpm/ml. I lavaggi finali dei filtri sono stati effettuati in SSC 2x (SSC = 0,15 M NaCl-0,015 M Na citrato) a temperatura ambiente ed in SSC 1x o SSC 0,1x a 65 °C. L'autoradiografia dei filtri di nitrocellulosa è stata realizzata a -70 °C per periodi di tempo variabili da 16 ore a più giorni.

Risultati e discussione

Rivelamento dell'infezione di BHV-1 nel seme bovino

Il plasmidio ricombinante pHV-2, derivato dal clonaggio del genoma di BHV- 1, in esperimenti di ibridazione su *dot-* e *Southern-blot* non mostra alcuna omologia con il genoma bovino e rivela fino a 2 picogrammi (pg) di DNA virale purificato (figura 1A).

Per quanto riguarda la specificità, questa sonda riconosce il genoma di BHV-1 con una efficienza da 100 a 500 volte superiore rispetto ai genomi di altri virus erpetici (virus erpetico bovino 2, citomegalovirus e virus della pseudorabbia). Allo scopo di valutare l'applicabilità di questa tecnologia nel rivelamento di BHV-1 nel seme bovino, il plasmidio pHV-2 è stato utilizzato in esperimenti di ibridazione molecolare su sistemi ricostituiti.

Il seme bovino infettato sperimentalmente è stato frazionato con una centrifugazione a bassa velocità e quindi il sopranatante e la frazione cellulare sono stati lisati con SDS-proteinasi K. In queste condizioni sperimentali la sonda pHV-2 rivela in *dot-blot* un numero di virioni in grado di provocare infezioni cellulari pari a 5x10^3-10^2 ($TCID_{50}$).

Questo livello di sensibilità è stato anche ottenuto utilizzando solo sospensioni virali titolate ad indicare che i componenti del seme non interferiscono nel rivelamento delle particelle virali.

Utilizzando questo metodo è stato quindi condotto uno studio su campioni di seme e su estratti di trachea di animali siero-positivi e siero-negativi per BHV-1 (figura 1B). I campioni di seme provengono da due animali, uno sieropositivo ("dot" *b* e *d*) e uno siero-negativo ("dot" *a* e *c*); gli estratti di trachea sono stati ottenuti da due animali sospetti positivi ("dot" *e* e *f*). Tutti i campioni analizzati, eccetto il seme dell'animale siero-negativo, risultano positivi in ibri-

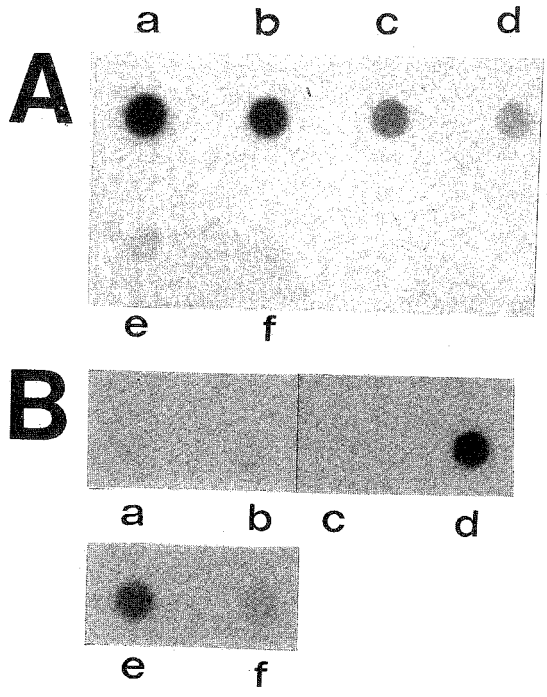


Figura 1 - **A) Ibridazione del plasmidio pHV-2-^{32}P a "dot" contenenti quantità variabili di DNA plasmidico (*a* = 60 pg; *b*= 30 pg; *c*= 15 pg; *d*= 7,5 pg; *e*= 3,85 pg; *f*= 1,9 pg) e B) a "dot" contenenti DNA isolato da seme, frazionato, mediante centrifugazione a bassa velocità, di due animali uno siero-positivo ("dot" *a*= sopranatante e *c*= frazione cellulare) e l'altro siero-positivo ("dot" *b*= sopranatante e *d*= frazione cellulare) per BHV-1. I "dot" *e, f* contengono DNA isolato da estratti di trachea di due animali sospetti positivi per BHV-1.**

dazione con la sonda pHV-2. È importante sottolineare che il campione di seme dell'animale siero-positivo è risultato negativo con il metodo di inoculazione su monostrati cellulari *in vitro*. Lo stesso metodo ha invece confermato la presenza di BHV-1 negli estratti di trachea.

Rivelamento di infezioni da BLV in linfociti bovini

Il plasmidio pBLV, in esperimenti di ibridazione su *dot-* e *Southern-blot* con sistemi ricostituiti, mostra un limite di sensibilità dell'ordine di 2-4 pg di DNA virale e nessuna omologia con il DNA di timo di vitello.

L'analisi condotta sul DNA estratto da linfociti circolanti di animali di età superiore all'anno, siero-negativi o siero-positivi per BLV e affetti o meno da LP, dimostra una perfetta correlazione fra diagnosi sierologica e molecolare (Gaudi *et al.*, 1987).

Inoltre l'analisi in *Southern-blot*, mediante digestione con enzimi di restrizione i cui siti sono presenti all'interno del provirus, fornisce informazioni riguardo al tipo di integrazione.

Ciò è di estrema utilità nella diagnosi della forma tumorale. Infatti, se il DNA è stato estratto da cellule policlonali rispetto al sito di integrazione del virus, la digestione con l'enzima BamHI (3 siti all'interno del genoma virale) origina solo due frammenti omogenei (2 Kb e 3, 5 Kb) (figura 2B), corrispondenti alla regione centrale del virus. Al contrario, in cellule tumorali monoclonali rispetto all'integrazione, la stessa digestione produrrà quattro frammenti omogenei in

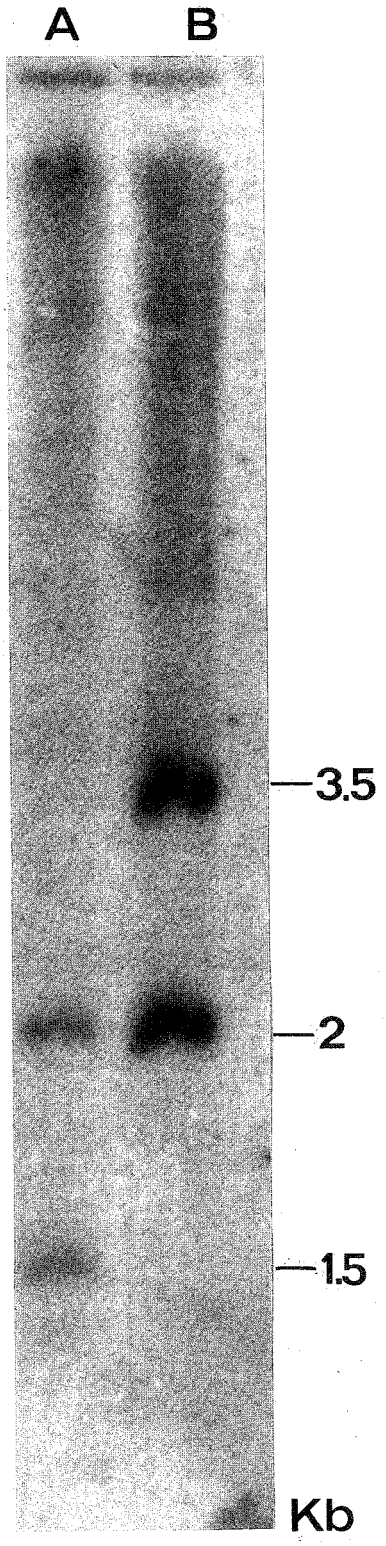


Figura 2 - **Ibridazione del plasmidio pBLV-^{32}P a campioni di DNA estratti dai leucociti di due bovini (*A* e *B*) siero-positivi per BLV al quarto mese di vita. I campioni di DNA, dopo digestione con l'endonucleasi di restrizione BamHI ed elettroforesi su gel di agarosio 0,6%, sono stati trasferiti su foglio di nitrocellulosa secondo il metodo di Southern ("Southern-blot") (1 kb = 1000 bp).**

quanto anche le regioni genomiche fiancheggianti saranno uguali in tutte le cellule.

Per verificare la potenzialità di questo sistema in animali nei primi mesi di vita, è stata condotta una indagine comparativa fra il metodo sierologico e quello molecolare in vitelli di madri siero-positive e siero-negative per BLV. Gli animali appartengono alla razza Frisona e provengono da un'unica mandria.

I risultati di questo studio indicano che: *a*)alla nascita non vi è correlazione fra la sierologia delle madri (10 siero-positivi su un totale di 13 animali) e quella dei rispettivi vitelli (8 siero-positivi su un totale di 13 animali); *b)* la siero-positività alla nascita si converte in siero-negatività in 3 vitelli al primo mese di vita ed in altri 4 al secondo mese; *c)* solo due vitelli, uno siero-positivo e l'altro siero-negativo alla nascita, risultano positivi in ibridazione molecolare con la sonda pBLV fin dal primo prelievo; *d)* due bovini (il siero-negativo si positivizza al secondo mese) mantengono la loro positività sierologica e molecolare fino al nono mese di vita.

I risultati ottenuti indicano quindi la superiorità nella diagnosi precoce del metodo basato sulla evidenziazione del genoma dell'agente infettante rispetto al metodo immunologico.

Inoltre, come mostrato in figura 2, l'analisi in *Southern-blot* delle caratteristiche strutturali dei provirus integrati nel DNA dei linfociti dei due vitelli positivi ha permesso di verificare che l'infezione può essere sostenuta anche da virus difettivi. Infatti, nel campione B la digestione con l'enzima BamHI origina due frammenti di 2 Kb e 3,5 Kb che derivano dalla regione centrale integra del provirus. Al contrario, nel campione A i frammenti originati misurano rispettivamente 2 Kb e 1,5 Kb. Ciò dimostra che il virus infettante il campione B è caratterizzato da una delezione interna di 2 Kb a carico della regione di 3,5 Kb. L'uso di sonde parziali del genoma di BLV ha permesso anche di stabilire che questi animali sono infettati da virus strutturalmente simili agli isolati americani e giapponesi (Sagata *et al.*, 1983).

BIBLIOGRAFIA

1) Deschamps J., Kettmann R., Burny A. (1981): Experiments with cloned complete tumor-derived bovine leukemia virus, information prove that the virus is totally exogenous to its target animal species. J. Virol., *40*, 605.

2) Gaudi S., Agresti A., Marozzi A., Ponti W., Bonizzi L., Poli G., Ginelli E. (1987): Rilevamento del virus della leucosi bovina (BLV) mediante ibridazione molecolare. La Clinica Vet., *110*, 207.

3) Kafatos F., Jones C.W., Efstratiaddis A. (1979): Determination of nucleic acid sequence homologies and relative concentration by a dot hybridization procedure.Nucl. Acids Res., *7*, 1541.

4) Pacciarini L., Agresti A., De Simone F., Poli G., Torretta E., Siccardi G., Meneveri R., Ginelli E. (1988): Detection of Bovine Herpes Virus 1 (BHV-1) semen infection by a dot-blot hybridation assay. Br. Vet. J., *144*, 55.

5) Sagata N., Ogawa Y., Kawamura J., Onuma M., Izaua H., Ikawa Y. (1983): Molecular cloning of bovine leukemia virus DNA integrated into the bovine tumor cell genome. Gene., *26*,1.

6) Southern E. (1975): Detection of specific DNA sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol., *98*, 503.

De Simone F., Brocchi E.
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia - Brescia

Potenzialità dell'impiego di anticorpi monoclonali nella diagnostica virologica

Introduzione

In genere le biotecnologie innovative originano per la risoluzione dei problemi della medicina umana; questi modelli in seguito vengono utilizzati da altre discipline.

Questo è vero anche nel caso di anticorpi monoclonali dapprima impiegati per la diagnosi di malattie infettive dell'uomo e poi in campo veterinario.

La ricerca in materia di reagenti innovativi è notoriamente costosa e si considera normale che produca un ritardo, in termini di profitto, per chi la sviluppa.

In campo umano viene sempre giustificato l'uso di reagenti per quanto costosi; ogni persona malata o minacciata viene presa in considerazione e monitorata; gli *screening* di massa sono attuati senza troppe esitazioni.

Ad esempio si consideri il gigantesco *business* del reagentario diagnostico per l'AIDS.

In medicina veterinaria lo sviluppo di reagenti diagnostici innovativi è modesto proprio per precise ragioni commerciali; non stupisce che vengano sviluppati e commercializzati *kits* diagnostici più frequentemente per gli animali d'affezione che per quelli di interesse economico.

Mentre per i primi è infatti sempre più diffusamente accettato un costo diagnostico anche elevato, per i secondi valgono ferree regole di costo-beneficio. La strettoia del profitto ha sempre reso modesto e poco commerciale il campo diagnostico degli animali di interesse economico, ove il malato viene soppresso se la cura costa più di quanto esso renda ed una diagnosi viene effettuata se il suo costo incide in piccola misura sul profitto previsto, ecc.

Per di più, in caso di malattie infettive, non tutti i soggetti malati sono protagonisti di un accertamento diagnostico ma solo qualche rappresentante; la diagnosi perciò verte più sull'allevamento che non sul singolo animale e questo riduce ulteriormente l'appetibilità commerciale che potrebbe trovare, nell'elevato numero di esami, un compenso allo scarso utile unitario.

Come esempio si può fornire quello della malattia aftosa in cui alcune decine di accertamenti diagnostici possono valere per decine di migliaia di soggetti colpiti o minacciati.

Inoltre, la possibilità di sviluppare o utilizzare reagenti diagnostici verso alcuni agenti infettivi (riprendiamo l'esempio dell'Afta), è devoluta esclusivamente a centri di ricerca dotati di laboratori con alta sicurezza di contenimento, autorizzati dalle Autorità Sanitarie, ecc.

Ai fatti sopra riportati si oppone l'ingente perdita causata dalle malattie infettive alla collettività zootecnica nazionale e di conseguenza l'utilità di un reagentario di qualità, base tecnica per una diagnosi accurata e precoce, a sua volta pre-

supposto indispensabile per un'efficace lotta, anche preventiva, alle malattie infettive.

Tutti gli elementi considerati incorniciano una situazione in cui, gravi problemi e forti danni economici, non prospettano profitti per le imprese private e quindi, a torto o a ragione, si considera che l'iniziativa debba venire dall'Ente Pubblico.

In tale ottica può essere inquadrato il notevole sforzo finanziario e scientifico fatto dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Brescia al fine di allestire un reagentario innovativo (anticorpi monoclonali) sviluppato per la diagnosi delle malattie infettive di origine virale degli animali di interesse economico.

Gli anticorpi monoclonali (MAb)

La possibilità di isolare e successivamente immortalizzare le singole cellule (linfociti B) coinvolte nella risposta immunitaria verso un antigene, ha posto le basi della tecnologia per la produzione di anticorpi monoclonali, rivoluzionaria come poche altre in biologia.

La singola cellula immortalizzata (ibridoma) produce una sola specie immunoglobulinica replicandola quando e quante volte desideriamo.

Se fra tutti gli ibridomi prodotti in un processo di fusione attuiamo un efficace *screening*, potremo avere quegli ibridomi producenti MAb diretti verso i siti (epitopi) più caratteristici e peculiari, ai fini di un preciso riconoscimento, dell'antigene di interesse.

In questo modo potremo evitare di introdurre nel saggio gli anticorpi che reagiscono con epitopi condivisi da antigeni similari o correlati a quello di interesse (fatto comune ai sieri immuni policlonali) ed il saggio stesso diventerà analiticamente molto specifico.

Operando così potremo utilizzare anticorpi in grado di riconoscere con estrema precisione il loro bersaglio distinguendolo dai bersagli similari ed avremo a disposizione un metodo altamente discriminante per distinguere, localizzare, quantificare, ecc. numerosissimi differenti componenti biologici.

Tra i più comprensibili impieghi dei MAb è da annoverare quello di identificazione di agenti eziologici di malattie infettive virali e batteriche.

Sviluppo di un MAb per la diagnostica virologica veterinaria

La validazione di un MAb diagnostico comporta l'evento fondamentale della sua produzione, oltre ad una serie di verifiche a monte e a valle di notevole complessità.

Una volta identificato il virus di interesse è necessario produrlo in una certa quantità e nella forma più pura e conservata possibile.

Questo esige un lavoro preliminare per la scelta di substrati sensibili (colture di tessuto, eventualmente animali) su cui riprodurre il virus in quantità sufficienti allo scopo; in seguito viene effettuata una serie di processi biochimici tendenti a purificarlo, concentrarlo e caratterizzarlo per portarlo alla forma ideale come immunogeno da utilizzare per l'induzione di cellule immunocompetenti nei topi Balb/c.

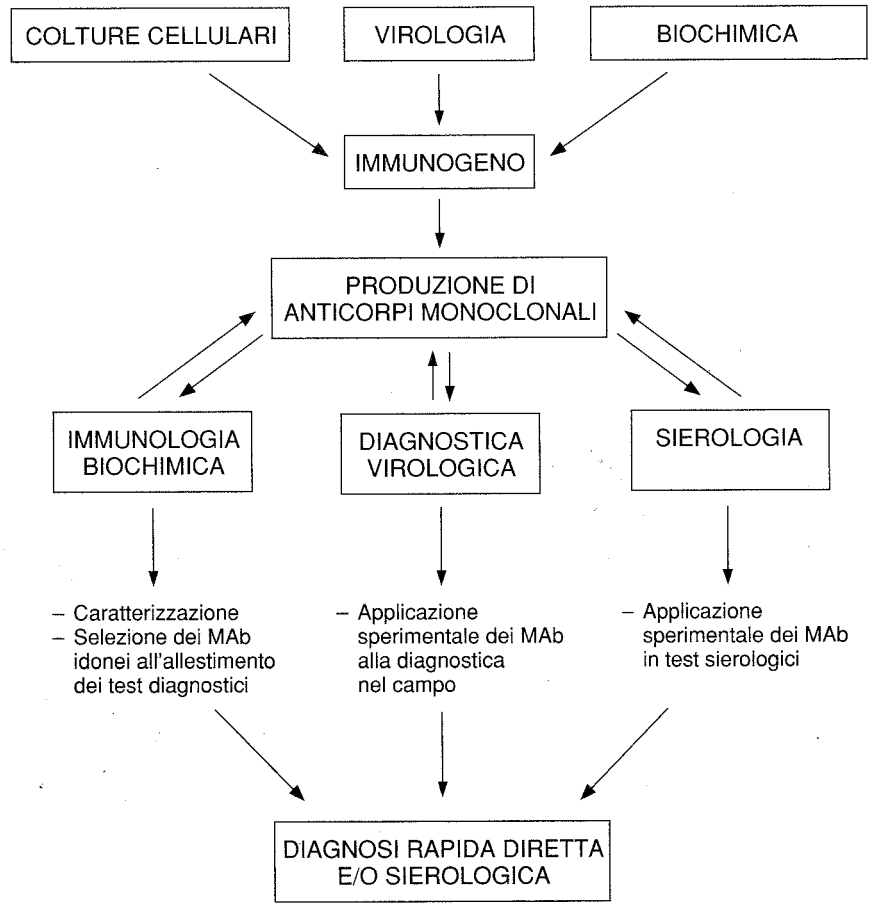
Dopo il procedimento di fusione che, come prima detto, fornisce le singole cellule immunocompetenti immortalizzate, si procede allo *screening* necessario ad identificare gli ibridomi di interesse: questo viene fatto con metodi immunobiochimici. Gli ibridomi accettati forniscono i MAb da saggiare su materiale patologico del campo in cui il virus, per svariati motivi, potrebbe presentarsi in stato di conservazione, quantità, reattività, ecc. non sempre coincidenti con le condizioni standardizzate del virus replicato in laboratorio.

Questo controllo deve essere fatto su un numero sufficiente di campioni patologici e no; in questa fase sono fondamentali precise notizie anamnestiche, riferimenti a sintomi clinici, ecc.

Il tempo necessario per la produzione e la validazione di MAb utili in diagnostica varia in genere da 6 mesi a 1 anno ed oltre.

Le tappe e le competenze richieste per la produzione e la validazione di MAB per impiego diagnostico sono riassunte nello schema 1.

Schema 1



Reazioni utilizzate con i MAb

Una volta validato il MAb, è necessario definire il protocollo di un saggio sufficientemente semplificato e trasferirlo agli utilizzatori, nel caso i laboratori diagnostici dell'Istituto.

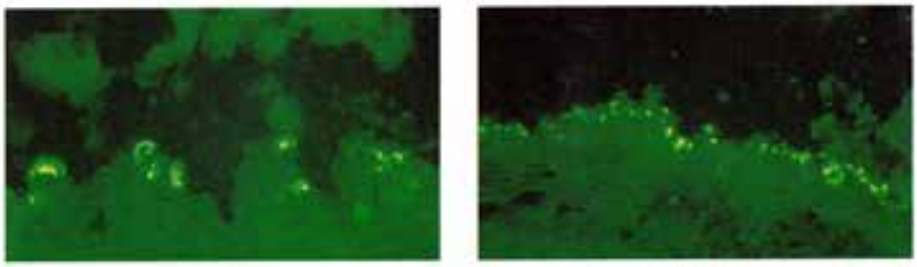
Le reazioni utilizzate sono l'immunofluorescenza (IF) e l'ELISA.

La prima è eminentemente utilizzata per l'identificazione diretta di virus nei campioni patologici e possiede pregi di rapidità di esecuzione e sensibilità.

I MAb utilizzati nella reazione, sia direttamente marcati con FITC o evidenziati da una anti -Ig di topo marcata con FITC, non presentano in genere reazioni di fondo; in alcuni casi forniscono elementi di maggior certezza interpretativa rispetto ai sieri policlonali poiché è previamente noto il loro comportamento di legame a particolari prodotti virali distribuiti caratteristicamente nella cellula infetta (esempio: forma, distribuzione, localizzazione di inclusi, ecc.). Esempi sono riportati nelle figure 1 e 2.

Figura 1 - **Distribuzione della fluorescenza in cellule di trachea bovina evidenziata con MAb anti- RSV diretti verso componenti virali a diversa localizzazione intracellulare**

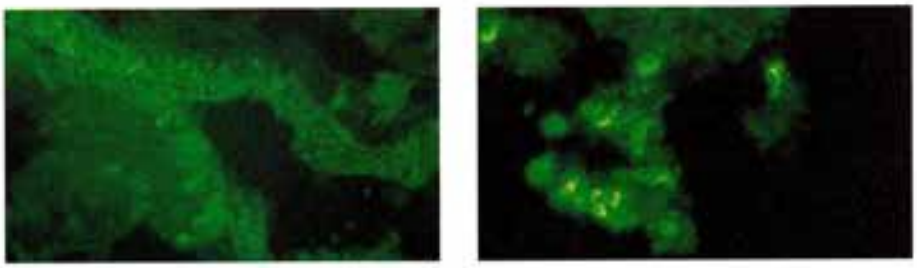
Reazione impiegata: Immunofluorescenza diretta.



a) b)

a) MAb (1G3) anti -RSV-FITC: fluorescenza ad inclusi intracitoplasmatici
b) MAb (2B4) anti- RSV-FITC: fluorescenza citoplasmatica diffusa

Figura 2 - **Aspetti di fluorescenza ottenuti da sezioni di intestino di bovini affetti da BVD**



Reazione impiegata:immunofluorescenza indiretta eseguita con una miscela di 6 diversi MAb anti-BVD; questo pannello di MAb copre la maggior parte di varianti presenti nel campo.

Sempre per l'identificazione di virus in campioni patologici, può essere usato un saggio ELISA-*sandwich* con coppie idonee di MAb. I monoclonali selezionati a questo scopo conferiscono al saggio caratteristiche di elevata specificità; per quanto riguarda la sensibilità, essa è correlata all'affinità dei MAb selezionati ed alla distribuzione nella particella virale degli epitopi bersaglio: mediamente un campione in esame deve contenere una massa virale corrispondente a 10^3 10^5 particelle infettate per dare esito positivo.

Questa condizione è in genere soddisfatta in caso di malattie tipo Afta, Malattia vescicolare dei suini, encefalomiocardite, BVD.

È da citare l'elevata percentuale di identificazione immediata di virus in ELISA rispetto ai metodi sierologici tradizionali: risultati comparativi in tal senso sono riportati nella tabella 1 unitamente ad importanti dati ottenibili con MAb nello studio approfondito del virus aftoso.

In campo di indagini sierologiche l'impiego di MAb e dell'ELISA offre spesso eccellenti risoluzioni di notevoli problemi tecnici.

Generalmente MAb assorbiti alla plastica in funzione di *catcher* sono in grado di legare alla fase solida esclusivamente l'antigene specifico da una miscela grezza (esempio: un liquido di coltura di cellule infettate) attuando una immunopurificazione e presentando al siero in esame, aggiunto successivamente, solo la parte immunologicamente interessante ai fini dell'identificazione dell'anticorpo: contrariamente sarebbe necessario legare alla plastica l'antigene purificato tramite processi complessi e di scarsa resa.

Fattore di vantaggio non trascurabile della reazione ELISA è la possibilità di sostituire reazioni ben più complesse ed indaginose (esempio: la neutralizzazione dell'infettività virale) e di essere realizzabile con antigeni virali inattiva-

Tabella 1 - **Impiego dei MAb allo studio dell'Afta epizootica**

Problematiche
- Esigenze di diagnosi rapida e sensibile
- Differenziazione tra tipi, sottotipi, varianti
- Controllo di qualità delle produzioni di vaccino

RICERCA	PRATICA
– Mappa epitopi	– DIAGNOSI → ELISA *sandwich*
– Identificazione siti immunodominanti	– SUBTIPIZZAZIONE → Varie metodiche ELISA
– Meccanismi di neutralizzazione e protezione	– SIEROLOGIA → ELISA competizione

	CLASSICA	ANTICORPI MONOCLONALI
DIAGNOSI e TIPIZZAZIONE	Sensibilità	
	60% – 1 GIORNO	98% – 3 ORE
SUBTIPIZZAZIONE	1 SETTIMANA	1 GIORNO
	Variabilità globale	Variabilità singoli epitopi

Tabella 2 - **Anticorpi monoclonali per la diagnostica virologica veterinaria prodotti presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia di Brescia.**

Antigene		N° Fusioni	N° Ibridi reattivi
FMDV	(picornavirus dell'Afta epizootica)		
Tipo	"O"	2	10
Tipo	"A" (Parma)	1	7
Tipo	"A" (Modena"	1	23
Tipo	"A" (106/86)	2	44
Tipo	"C"	2	45
Tipo	"O" (etero-ibrido bovino x topo)	3	2
Tipo	"A" (etero-ibrido bovino x topo)	3	5
Tipo	"C" (etero-ibrido bovino x topo)	3	12
hRSV	(mixovirus respiratorio sinciziale umano)	1	60
bRSV	(paramixovirus respiratorio sinciziale bovino)	1	11
BHV-1	(herpesvirus della Rinotracheite dei bovini)	1	70
BVD	(togavirus della Diarrea virale dei bovini)	4	12
VVM	(retrovirus Visna-Maedi degli ovini)	8	15
PRV	(herpes virus della Pseudorabbia dei suini)	2	75
EMC	(picornavirus dell'Encefalomiocardite dei suini)	1	4
MVS	(enterovirus della Malattia vescicolare dei suini)	3	11
PSC	(togavirus della Peste suina, etero-ibrido suino x topo)	1	1
IBV	(coronavirus della Bronchite infettiva dei polli)	2	66
IgG	bovina	4	13
IgM	bovina	4	81
IgG_1	bovina	2	9
IgA	bovina	3	5
IgG	suina	4	14
IgM	suina	2	64
IgA	suina	1	4
Totale		61	663

ti: questo rende possibile l'estensione ai laboratori diagnostici periferici dell'esame di anticorpi verso virus che, nella forma infettante, possono essere maneggiati da pochi laboratori particolarmente attrezzati (esempio virus aftoso, virus esotici, in genere virus pericolosi per l'uomo o per gli animali).

Sviluppo di un reagentario monoclonale

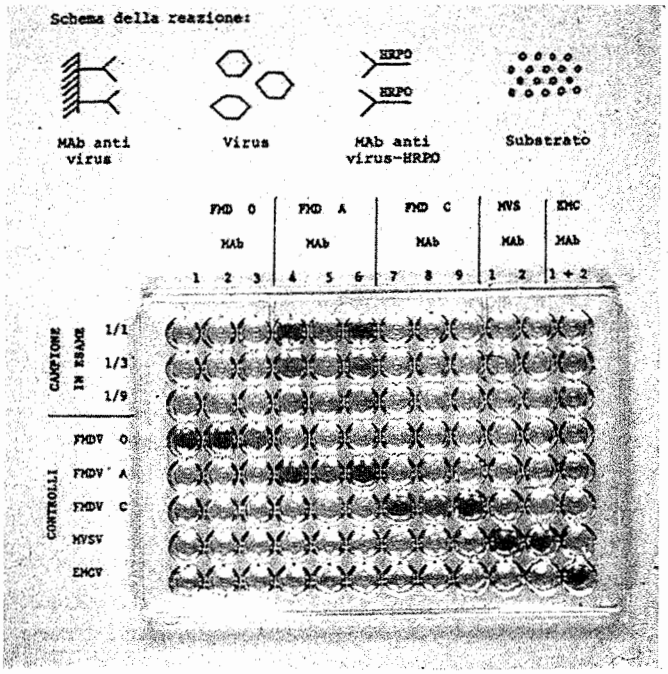
Tenuto conto dei tempi e della complessità sono intuibili gli sforzi ed il lavoro necessari per sviluppare un reagentario diagnostico monoclonale; il lavoro finora svolto presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Brescia ha permesso di ottenere anticorpi utili per un certo numero di malattie di rilevante importanza.

Un elenco dei monoclonali prodotti è riportato nella tabella 2.

Da questa è possibile notare l'esistenza di antigeni, per così dire "facili" (esempio, BHV-l di cui sono stati ottenuti 70 ibridi positivi in 1 fusione) ed altri "difficili" (esempio PSC, 1 ibrido da 1 fusione).

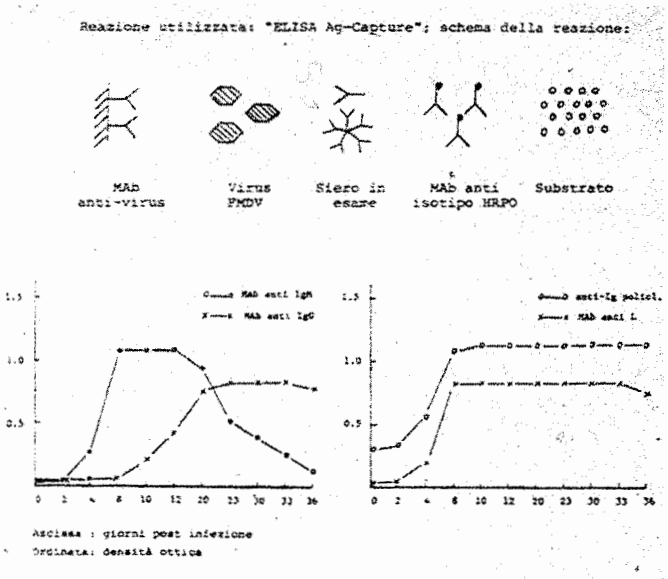
Lo scopo finale del reagentario non è meramente quello di ottenere monoclonali ma "ventagli" di monoclonali da utilizzare in modo coordinato in situazio-

Figura 3 - **Risultato di una reazione ELISA- *sandwich* con MAb per la diagnosi differenziale di Afta da sierotipo O, A, C, Malattia vescicolare dei suini, Encefalomiocardite.**



Il campione esaminato risulta positivo per Afta di tipo A. L'esito è convalidato dalla reazione positiva di tutti i controlli in corrispondenza dei MAb specifici.

Grafico 1 - **Cinetica delle IgM e IgG anti-aftose nel bovino dopo infezione.**



ni diagnostiche dove l'anamnesi e/o i sintomi clinici possono portare a sospettare più di un agente eziologico.

Una diagnosi in tempi brevi comporta che vengano allestiti questi "ventagli diagnostici" per situazioni in cui la differenziazione rapida è importante, tipo: "Peste suina classica e Peste suina africana, oppure Rabbia e Malattia di Aujeszky, ecc.".

Un esempio classico è quello in cui si riscontrano malattie con sintomi clinici simil-aftosi nei suini; in questo caso bisogna dirimere tra 3 principali agenti virali: quello dell'Afta, quello della Malattia vescicolare dei suini e quello dell' Encefalomiocardite.

Questo "ventaglio diagnostico" è stato realizzato ed attualmente una batteria di monoclonali in ELISA-*sandwich* permette di ottenere, nel giro di 3 ore, la diagnosi tra Afta (da virus di tipo O, A e C), Malattia vescicolare dei suini (da sierotipo Italia '66 o Italia '72) ed Encefalomiocardite (esempio in figura 3).

Anche in caso di malattie respiratorie di origine virale del bovino è ora possibile utilizzare, nel primo intervento diagnostico, MAb in grado di distinguere tra i più frequenti virus sospettati o sospettabili in quella situazione patologica (BHV-1, RSV, BVD).

Considerazioni simili, anche se per applicazioni differenti, hanno consigliato l'allestimento di monoclonali anti-isotipi bovini e suini, specie più frequentemente esaminate in sierologia.

L'uso preponderante di questi MAb consiste nella loro utilizzazione come secondo anticorpo in reazioni sierologiche indirette; esistono però situazioni in cui è consigliabile un'accurata quantificazione di differenti Ig di determinata specificità.

Ad esempio se l'indagine non è di tipo epidemiologico ma diagnostico è necessario l'esame di un doppio campione di siero prelevato nelle fasi iniziali e finali della malattia: alternativamente l'analisi di differenti classi di Ig mediante MAb anti-IgM e -IgG permette di stabilire, dall'esame di un solo campione di siero, lo stadio evolutivo dell'infezione.

Un esempio applicativo è fornito nel grafico 1 in cui si nota l'andamento cronologico di IgM e IgG di specificità antiaftosa rilevate in un bovino dopo l'infezione: è evidente il classico e noto andamento di queste classi isotipiche rispetto al risultato ottenibile con un'anti-Ig policlonale.

Gli anti-isotipi monoclonali consentono un'elevata standardizzazione dei metodi e quindi dei risultati dato che è possibile utilizzare, su scala per quan-

Tabella 3 - **Elenco dei reagenti e delle relative possibilità di indagine diagnostica già disponibili o in preparazione presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia di Brescia.**

Malattia o specificità	Finalità dell'indagine	Disponibilità del reagente	Controllo e caratterizzazione	Reazione utilizzata
FMDV	Tipizzazione dei virus O,A,C	Pronta	Ok	ELISA MAb
FMDV	Subtipizzazione O,A,C	Pronta	Ok	ELISA MAb
FMDV	Determinazione di anticorpi	Pronta	Da eseguire	ELISA MAb

Malattia o specificità	Finalità dell'indagine	Disponibilità del reagente	Controllo e caratterizzazione	Reazione utilizzata
MVS	Identificazione e subtipizzazione	Pronta	Ok	ELISA MAb
MVS	Determinazione di anticorpi	Pronta	Da eseguire	ELISA MAb
EMC	Identificazione del virus	Pronta	Ok	ELISA MAb
EMC	Determinazione di anticorpi	Pronta	Ok	ELISA MAb
FMDV-MVS-	Differenziazione simultanea			
EMC	di malattie simil-aftose	Pronta	Ok	ELISA MAb
BHV-1	Identificazione del virus	Pronta	Ok	ELISA MAb-IF
BHV-1	Determinazione di anticorpi	Pronta	Ok	ELISA MAb
BVD	Identificazione del virus	Pronta	Ok	ELISA MAb-IF
BVD	Determinazione di anticorpi	Pronta	Ok	ELISA MAb
RSV	Identificazione del virus	Pronta	Ok	ELISA MAb-IF
RSV	Determinazione di anticorpi	Pronta	Ok	ELISA MAb
VVM	Determinazione di anticorpi	Pronta	Ok	ELISA MAb
PRV	Identificazione del virus	Pronta	Da eseguire	ELISA MAb-IF
PRV	Determinazione di anticorpi	Pronta	Da eseguire	ELISA MAb
PSC	Identificazione del virus	In preparaz.		ELISA MAb-IF
PSC	Determinazione di anticorpi	In preparaz.		ELISA MAb
IBV	Identificazione del virus	In preparaz.		
IBV	Determinazione di anticorpi	Pronta	Ok	ELISA
Chlamydia (ovis)	Identificazione	In preparaz.		
Chlamydia (ovis)	Determinazione di anticorpi	In preparaz.		
BHV-4	Determinazione di anticorpi	Pronta	Ok	ELISA MAb
NDV	Determinazione di anticorpi	Pronta	Ok	ELISA
IBDV	Identificazione del virus	In preparaz.		ELISA
IBDV	Determinazione di anticorpi	Pronta	Ok	ELISA
Reovirus	Determinazione di anticorpi	In preparaz.		ELISA
TRT	Determinazione di anticorpi	In preparaz.		ELISA
Rotavirus A	Identificazione del virus	Pronta	Da eseguire	ELISA
Rotavirus A	Determinazione di anticorpi	In preparaz.		ELISA
Coronavirus bovino	Identificazione del virus	Pronta	Ok	IF
LEB	Determinazione di anticorpi	Pronta	Ok	ELISA MAb
Adenovirus aviari	Determinazione di anticorpi	In preparaz.		
LT	Determinazione di anticorpi	In preparaz.		
PI-3	Determinazione di anticorpi	Pronta	Ok	HI
PPV	Determinazione di anticorpi	Pronta	Ok	HI
Brucellosi	Determinazione di anticorpi	Pronta	Da eseguire	ELISA
α-IgG$_1$ Bovina	Secondo anticorpo	Pronta	Ok	ELISA MAb
α-IgG$_2$ Bovina	Secondo anticorpo	Pronta	Ok	ELISA MAb
α-IgM Bovina	Secondo anticorpo	Pronta	Da eseguire	ELISA MAb
α-IgA Bovina	Secondo anticorpo	Pronta	Da eseguire	ELISA MAb
α-IgG Suina	Secondo anticorpo	Pronta	Da eseguire	ELISA MAb
α-IgM Suina	Secondo anticorpo	Pronta	Da eseguire	ELISA MAb
α-IgA Suina	Secondo anticorpo	Pronta	Da eseguire	ELISA MAb
α-Ig Coniglio	Secondo anticorpo	Pronta	Ok	IF-ELISA
α-Ig Pecora	Secondo anticorpo	Pronta	Ok	IF-ELISA
α-Ig Topo	Secondo anticorpo	Pronta	Ok	IF-ELISA
α-Ig Pollo	Secondo anticorpo	Pronta	Ok	IF-ELISA
α-Ig Equino	Secondo anticorpo	Pronta	Ok	IF-ELISA

Legenda

FMDV = Afta; MVS = Malattia vescicolare dei Suini; EMC = Encefalo miocardite dei Suini; BHV-1 = Rinotracheite Infettiva dei Bovini; RSV = Virus Respiratorio Sinciziale dei Bovini; VVM = Virus Visna-Maedi; PRV = Virus di Aujeszky; PSC = Peste Suina Classica; IBV = Virus della Bronchite Infettiva dei Polli; BHV-4 = Virus Erpetico IV del Bovino; NDV = Pseudopeste Aviare; IBDV = Gumboro; TRT = Rinotracheite del Tacchino; LEB = Leucosi Bovina; LT = Laringotracheite Aviare; PI-3 = Para-influenza 3; PPV = Parvovirus dei Suini. MAb = Anticorpo monoclonale; α= Anti; IF = Immunofluorescenza; HI = Inibizione emoagglutinazione

to si voglia vasta, una unica ed immutabile anti-Ig o una miscela bilanciata di queste.

A complemento è riportata la tabella 3 in cui vengono descritti in dettaglio gli esami virologici o sierologici realizzabili con i reagenti monoclonali o policlonali già prodotti o in preparazione.

Conclusioni

La disponibilità di idonei anticorpi monoclonali permette di aumentare considerevolmente la specificità, sensibilità, rapidità e standardizzazione di indagini virologiche e sierologiche in diagnostica veterinaria.

La preparazione di anticorpi monoclonali è lunga e laboriosa; al costo non indifferente della ricerca necessaria per ottenerli fa riscontro un mercato commercialmente poco remunerativo che scoraggia l'iniziativa dell'impresa privata.

Il notevole lavoro dell'Istituto Zooprofilattico in questo campo ha prodotto un consistente numero di reagenti utilizzati dai centri diagnostici dell'Istituto stesso.

Considerando che l'utilizzazione di tali reagenti viene fatta per un servizio globalmente riferibile alla Sanità Pubblica, sono auspicabili le iniziative o i progetti atti ad estendere l'impiego alla collettività degli Enti preposti a tale compito.

Scanziani E., Rovetta G., Gagnone G.
Istituto di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviare, Facoltà di Medicina Veterinaria
Università degli Studi di Milano

Attualità sulle tecniche bioptiche isto/citologiche in patologia veterinaria

Introduzione

Lo studio macro/microscopico delle alterazioni anatomiche costituisce da lungo tempo la base per l'interpretazione dei processi patologici. Tale studio è stato condotto finora soprattutto su animali morti, ma oggi, sempre più frequentemente, il clinico richiede un supporto anatomopatologico al fine di ottenere o precisare una diagnosi *intra vitam*. Per tale motivo sono state studiate diverse tecniche di biopsia in ordine ai diversi campi applicativi, specie animali, tipo di esame, ecc. atte ad ottenere, nel modo meno cruento possibile, frammenti di tessuto o un certo numero di cellule da sottoporre ad esame microscopico.

Fra le lesioni che più spesso sono oggetto delle tecniche bioptiche vi sono sicuramente le malattie neoplastiche, dove assume un'importanza fondamentale la precisa tipizzazione del tumore, non solo nei riguardi del suo grado di benignità o di malignità, ma anche per fornire utili criteri prognostici e terapeutici. Ciò è particolarmente sentito al giorno d'oggi in quanto l'approccio terapeutico nei confronti delle neoplasie sta cambiando e cambierà ulteriormente in futuro, indirizzandosi verso l'utilizzo di protocolli chirurgici, farmacologici o radioterapeutici diversi a seconda del tipo di tumore e grado di malignità. Alla luce di queste considerazioni acquista grande importanza l'impiego di quelle metodiche che permettono il raggiungimento della diagnosi e del *grading* delle neoformazioni in sede preoperatoria.

Tale trattazione non vuole ritenersi esauriente di un argomento estremamente vasto qual è quello delle tecniche bioptiche, ma piuttosto intende puntualizzare quegli aspetti particolarmente importanti e di attualità in patologia veterinaria.

Le tecniche bioptiche possono essere suddivise in due gruppi principali: le biopsie citologiche e le biopsie istologiche.

Biopsie citologiche

La citopatologia diagnostica, che fonda le sue basi sullo studio morfologico di cellule singole o variamente aggregate, può essere schematicamente divisa in citologia esfoliativa, abrasiva ed ago-aspirativa.

Nel primo caso vengono raccolte cellule che, sfaldatesi spontaneamente da alcuni organi, raggiungono, dopo un tragitto più o meno lungo, la sede di prelievo. In questo gruppo vanno inserite la citologia urinaria, attraverso la quale si può osservare nelle urine la presenza di cellule provenienti da uretra, vescica, ureteri e più raramente dai reni e dalla prostata, la citologia dei versamenti sie-

rosi che permette la raccolta di cellule di varia origine e natura ed ancora la citologia di organi ed apparati che meno frequentemente sono oggetto di indagine citologica in campo veterinario quale ad esempio il liquido cefalorachidiano.

L'utilizzo di tecniche abrasive (spatole, spugne, ecc.) permette una più completa indagine citologica in quanto è possibile effettuare il prelievo direttamente da mucose poste in profondità quali quella endometriale e, con l'ausilio di indagini endoscopiche, anche da quella bronchiale, gastrica ed intestinale.

La citologia ago-aspirativa ha ulteriormente ampliato le possibilità diagnostiche di questa disciplina permettendo il prelievo di cellule da organi o tessuti non comunicanti con l'esterno.

Citologia esfoliativa ed abrasiva

Citologia dei versamenti sierosi

Con l'utilizzo di una normale siringa è possibile raccogliere materiale da sottoporre ad esame citologico partendo da versamenti peritoneali, toracici ed anche dal liquido cefalorachidiano ed intrarticolare.

Dopo adeguata centrifugazione, si allestiscono gli strisci che vengono fissati e colorati.

Con tale esame è possibile identificare la natura infiammatoria o neoplastica di alcuni versamenti e, a tale proposito, si ricorda come non raramente, in corso di processi neoplastici primitivi o metastatici del polmone, si possa avere un interessamento delle pleure con presenza massiccia di cellule neoplastiche nel liquido pleurico (figura 1).

Citologia broncopolmonare

Per ottenere campioni citologici della mucosa bronchiale, in medicina veterinaria vengono utilizzate due tecniche: lo spazzolamento (*brushing*), ed il lavaggio (20).

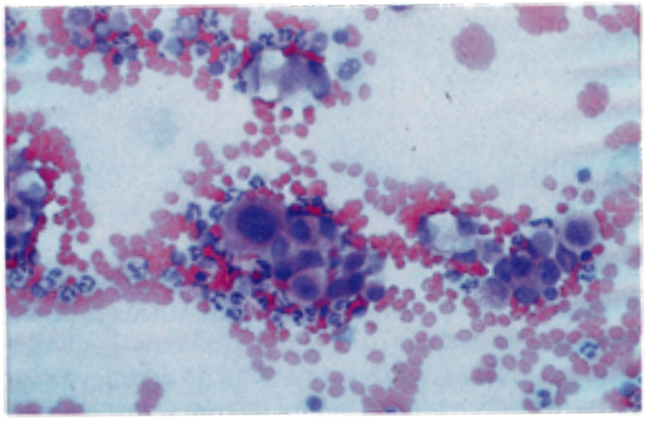


Figura 1 - **Cane, versamento pleurico. E.E. 500 x**
Cellule carcinomatose sono osservabili nel versamento pleurico in un caso di adenocarcinoma mammario metastatizzante al polmone con coinvolgimento della pleura.

Tutte e due le tecniche vengono messe in atto con l'animale in anestesia generale gassosa e con l'ausilio di un broncoscopio a fibre ottiche che permette l'osservazione diretta della sede del prelievo.

Il *brushing* viene praticato attraverso l'introduzione nel broncoscopio della spazzola bronchiale con la quale si raccolgono cellule che, depositate su vetrini, sono sottoposte alle usuali tecniche citodiagnostiche.

Il lavaggio bronchiale invece è attuato grazie all'introduzione, frazionata nel tempo, di una quantità di soluzione salina proporzionata al peso del soggetto, che viene successivamente aspirata per mezzo del broncoscopio e che è destinata, previa centrifugazione, o meglio citocentrifugazione, all'allestimento di strisci citologici.

Citologia gastroenterica

Le tecniche di prelievo di campioni della mucosa del tubo digerente da sottoporre ad esame citologico sono essenzialmente di due tipi: il lavaggio e lo spazzolamento.

Il lavaggio è praticato attraverso l'uso di una sonda esofagea, gastrica o rettale, con la quale viene immessa una determinata quantità di soluzione fisiologica che dopo poco tempo è aspirata tramite una siringa connessa alla sonda. Il liquido prelevato viene centrifugato, posto su vetrini, quindi fissato e colorato.

Per quanto riguarda lo spazzolamento, si possono eseguire tecniche alla cieca, mediante palloncini a superficie rugosa, oppure *brushing* mirati su aree ben definite della mucosa gastroenterica per mezzo di indagini endoscopiche.

Citologia urinaria

Per ottenere un'adeguata quantità di cellule è opportuno raccogliere, mediante catetere, tutta l'urina presente in vescica, ed una maggior possibilità diagnostica viene raggiunta prelevando più campioni del soggetto in giornate successive. È altresì necessario fissare il più rapidamente possibile gli strisci in quanto le urine si alterano rapidamente (19).

Dal punto di vista interpretativo bisogna tenere presente che le cellule esfoliate, persi i rapporti di vicinanza con gli elementi contigui, possono assumere una forma ed un volume diversi da quelle presenti *in situ* ed inoltre che alcune neoplasie vescicali, in particolare le forme papillari, sono caratterizzate da una notevole differenziazione, cosicché le loro cellule sono assai simili a quelle normali. Ancora, nel corso di forme infiammatorie, la presenza di sangue, frammenti cellulari e batteri può rendere difficoltosa una corretta diagnosi e, quando tali forme sono associate a litiasi, gli elementi cellulari dell'urotelio possono presentare alterazioni quali un aumento di volume, una spiccata prominenza nucleare ed anche due o tre nucleoli che non sono presenti in cellule normali. Pur tuttavia, anche per le neoplasie vescicali, valgono gli usuali criteri citologici di malignità, e cioè l'aumento del volume nucleare, l'ipercromia della trama cromatinica, la presenza di nucleoli multipli e prominenti, l'aumento del rapporto nucleo-citoplasma, la frequenza di forme cariocinetiche e le eventuali loro anomalie.

Citologia vaginale

Largo impiego ed interessanti risultati sono stati raggiunti dalla tecnica dello striscio vaginale, in particolar modo negli animali domestici d'affezione(17).

La colpocitologia permette al veterinario di diagnosticare diverse alterazioni dell'apparato genitale femminile, nonché di determinare con precisione le varie fasi del ciclo estrale, tra le quali, in particolare, il momento ovulatorio.

Il prelievo è di facile esecuzione: con una spatola atraumatica si raccoglie il materiale a livello della volta della vagina, in corrispondenza della zona vulvovestibolare. Quindi si effettuano gli strisci che, dopo adeguata fissazione, vengono colorati preferibilmente con il metodo di Papanicolaou.

Biopsia per aspirazione con ago sottile

La biopsia per aspirazione con ago sottile (FNAB: *Fine Needle Aspiration Biopsy*) è una tecnica di diagnosi citologica che deriva concettualmente dalla citologia esfoliativa e che, nata intorno agli anni '30 negli Stati Uniti, si è sviluppata nel dopoguerra in particolare in Scandinavia e successivamente ha trovato ampia diffusione in tutto il mondo (9).

In diagnostica veterinaria la FNAB è di applicazione assai recente in quanto i primi lavori sono stati pubblicati negli USA verso la metà degli anni '70.

La FNAB è una metodica di facile e veloce esecuzione che richiede però alcuni particolari accorgimenti, nonché una certa esperienza, per ottenere risultati validi e riproducibili (figura 2).

Dopo aver immobilizzato il nodulo in esame ed aver disinfettato la cute che lo ricopre, vi si penetra con un ago da 21 *gauge*, applicato ad una siringa da 20 ml, e si compiono dei movimenti di aspirazione con lo stantuffo al fine di prelevare una certa quantità di materiale che di solito, nel caso di formazioni solide, è appena sufficiente ad occupare l'incavo dell'ago. Quindi, dopo aver allentato la pressione negativa, si estrae l'ago dal nodulo e si depone il materiale prelevato su vetrini. Tale materiale viene lasciato asciugare a temperatura ambiente per qualche minuto e quindi fissato in alcool metilico per 5 minuti. È necessario allestire, per ogni campione, almeno tre vetrini, dei quali uno colorato con metodi panottici (Giemsa, Wright o May-Grünwald Giemsa) che offrono una buona definizione degli aspetti nucleari, un altro colorato con il metodo di Papanicolaou, utile per la valutazione dei quadri citoplasmatici, ed il terzo destinato a colorazioni speciali che all'occorrenza possono risultare utili, quali il Blu di Toluidina, l'Oil Red O, l'Alcian Pas, ecc. È possibile inoltre effettuare su preparati citologici colorazioni di tipo immunoistochimico (figura 3).

La FNAB ha una vasta possibilità di impiego. Innanzitutto può essere utilizzata per lo studio dei tumori mammari e della cute per i quali, data la facile ed incruenta tecnica, rappresenta il più valido ausilio diagnostico preoperatorio; inoltre possono essere aspirati organi o strutture quali linfonodi, ghiandole salivari, tiroide, milza, fegato, testicolo ed osso che per natura o per particolari condizioni patologiche risultano aggredibili per via percutanea (16).

L'agoaspirazione del midollo osseo, che è di frequente applicazione in patologia veterinaria, essendo un importante ausilio nella diagnostica di leucemie

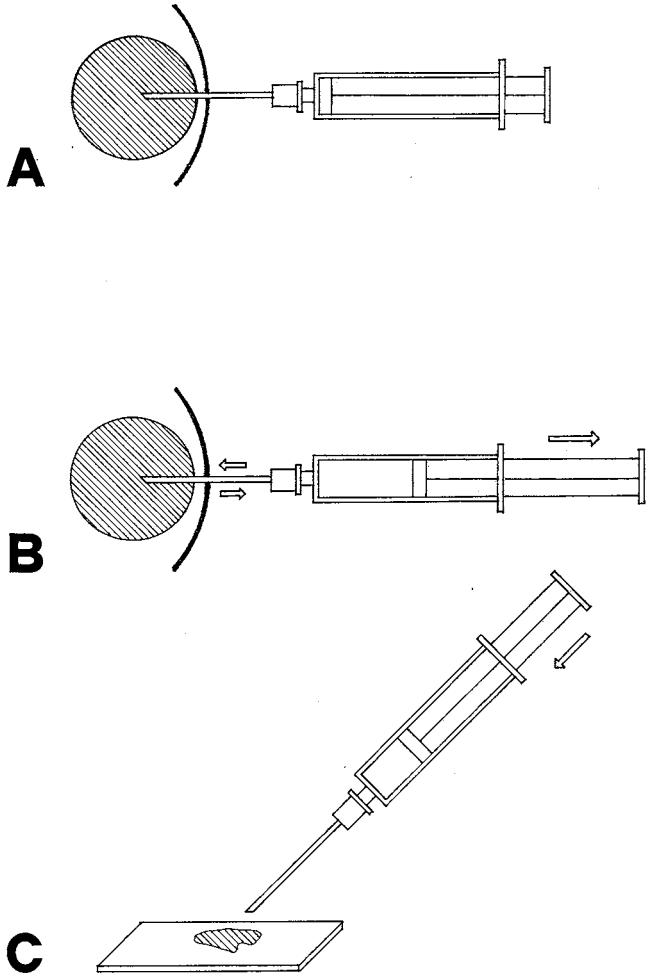


Figura 2 - **Modalità di prelievo agoaspirativo.**

ed anche di alcune malattie protozoarie, necessita di particolari aghi tra i quali i più frequentemente usati sono l'ago di Osgood e l'ago di Rosenthal, nella misura di 16-18 *gauge*, dotati di un mandrino che scorre all'interno dello strumento. Le sedi di elezione per effettuare il prelievo sono rappresentate dallo sterno, dalla cresta iliaca e dalla fossa trocanterica dell'epifisi prossimale del femore (28). Previa adeguata sedazione, anestesia locale e tricotomia, si esegue una breve incisione sulla cute e si penetra con l'ago fino a perforare la corticale dell'osso. Quindi si ritira il mandrino e si aspira una certa quantità di midollo osseo che, strisciato su vetrini, viene fissato e colorato.

Per quanto riguarda organi e masse intraddominali ed intratoracici profondi, la FNAB in medicina umana viene praticata sotto guida ecografica diretta, anche grazie all'uso di aghi di Menghini per biopsie citologiche, dotati, all'apice dello strumento, di *marker* ecogeno.

La nostra esperienza, che si è svolta finora prevalentemente su neoformazioni di origine cutanea o mammaria, ha portato a conclusioni sovrapponibili ad

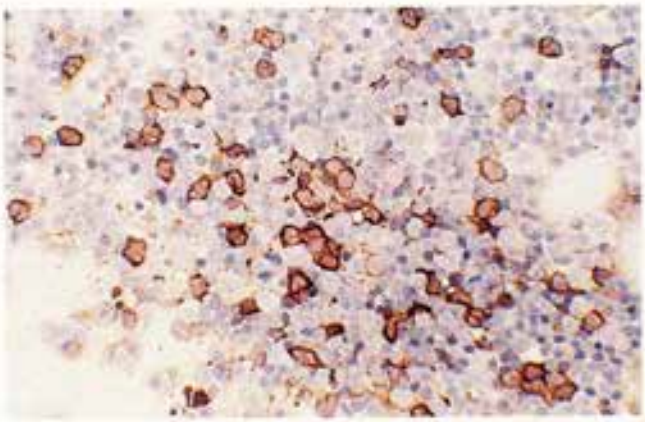


Figura 3 - **Cane, linfonodi ascellari, FNAB, Immunoperossidasi (ABC) per citocheratine. 500x**
Cellule carcinomatose metastatiche, a partenza da adenocarcinoma mammario, sono selettivamente colorate in marrone.

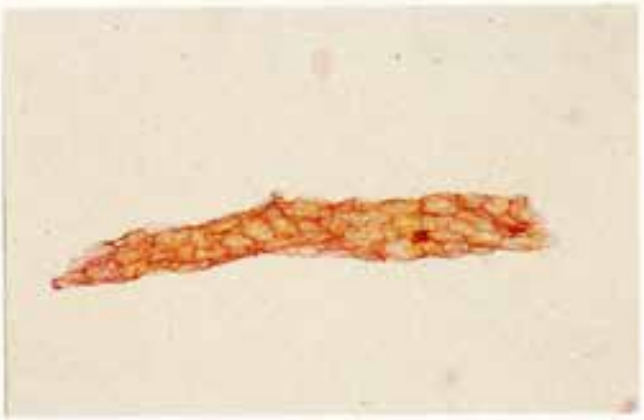


Figura 4 - **Cane, neof. cutanea, FNAB, E.E. 30 x**
Lipoma. Frustolo di tessuto adiposo la cui forma ricalca l'incavo dell'ago.

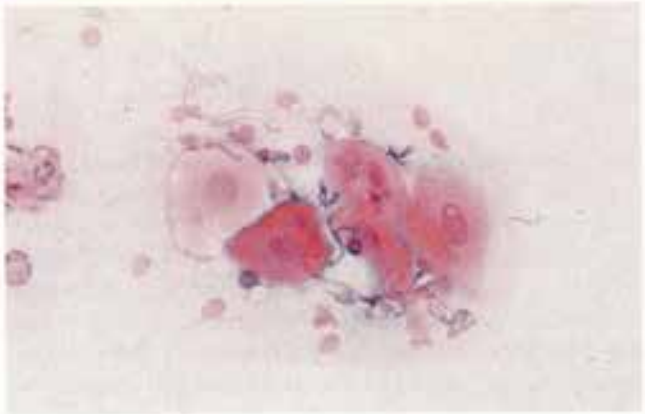


Figura 5 - **Cane, neof. cutanea, FNAB, Papanicolaou. 500 x**
Carcinoma squamoso.

altre già pubblicate (23). In particolare sono stati raggiunti buoni risultati nella diagnosi di alcuni tipi di tumori, quali ad esempio quelli del tessuto adiposo (figura 4), delle ghiandole sebacee, i carcinomi squamosi ed i mastocitomi, che offrono quadri citologici costanti e tipici, come riferito anche da diversi autori (8,13).

Il reperto caratteristico dei carcinomi squamosi, ad esempio, è dato dalla pre-

senza di elementi epiteliali nettamente maligni, alcuni dei quali in preda a metaplasia squamosa che risulta particolarmente evidente nei preparati colorati con il metodo di Papanicolaou (figura 5). Altrettanto tipico è risultato il reperto dei mastocitomi, in particolare nei preparati colorati con il metodo di May-Grünwald Giemsa, nei quali i caratteristici granuli citoplasmatici appaiono colorati metacromaticamente (figura 6).

Per altri tipi tumorali (tumori del tessuto connettivo, tumori mammari) talvolta si è giunti a stabilire solo l'origine tissutale e la natura benigna o maligna della lesione, senza poterne individuare esattamente il tipo classificativo (figura 7).

Nel caso di lesioni non tumorali raramente si è giunti ad una diagnosi precisa, anche se sempre abbiamo potuto escludere la natura neoplastica della lesione.

I vantaggi della FNAB sono soprattutto di ordine pratico. Infatti tale tecnica è di facile e veloce esecuzione, si esegue per lo più in sede ambulatoriale, non richiede anestesia locale, se non in qualche caso di neoformazioni ossee ed è estremamente economica (16). Inoltre, data la sua collocazione preoperatoria, è in grado di fornire al clinico utili indicazioni circa la terapia da effettuare (exeresi chirurgica, chemioterapia, ecc.) e suggerisce talvolta l'inutilità di qualsiasi trattamento.

Il limite maggiore, come sottolineato da diversi autori, risiede nell'inesperienza di chi è deputato a leggere i preparati ed in una non sufficiente collaborazione tra il citologo ed il clinico, soprattutto là dove l'intera sequenza delle operazioni, dal prelievo alla formulazione della diagnosi, è svolta da differenti persone (15,22). Per quanto riguarda il presunto pericolo di disseminazione di cellule tumorali lungo il tragitto dell'ago, studi di patologia umana tendono ad escludere, o quantomeno a limitare fortemente, questa possibilità (2,10).

Apposizione

L'apposizione citologica è una tecnica di diagnosi rapida consistente nell'eseguire un'impronta diretta su un vetrino a partire da una superficie di taglio fresca. Tale metodica non presenta alcun vantaggio, dal punto di vista dell'accuratezza diagnostica, rispetto alla FNAB, ed è utilizzata quale ausilio diagnostico rapido in sede intraoperatoria.

Biopsie istologiche

Per biopsia istologica si intende il prelievo *in vivo* di tessuto od altro materiale da sottoporre alle usuali tecniche istopatologiche che prevedono la fissazione, l'inclusione in paraffina o resine, il taglio al microtomo e la colorazione delle sezioni così ottenute.

Non raramente, per particolari esigenze cliniche, ad esempio in sede intraoperatoria, sono richiesti tempi più brevi per ottenere la diagnosi. A tal fine l'esame istologico condotto su sezioni criostatiche permette di raggiungere questo risultato dopo pochi minuti dal prelievo.

La nostra esperienza in questo campo ha portato a conclusioni simili a quel-

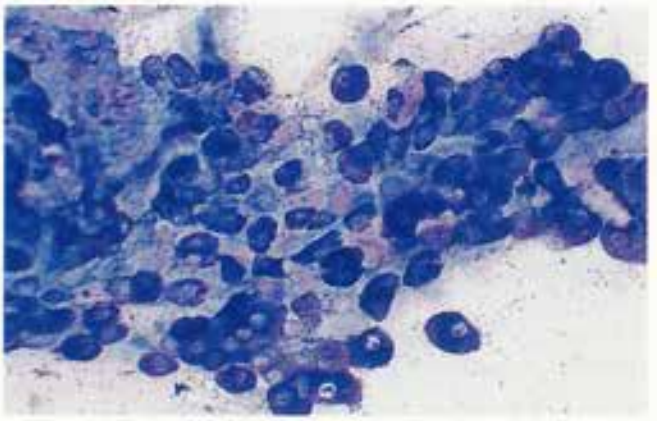


Figura 6 - Cane, neof. cutanea, FNAB, Giemsa. 400 x
Mastocitoma. Nel citoplasma delle cellule neoplastiche sono ammassati numerosi granuli colorati metacromaticamente.

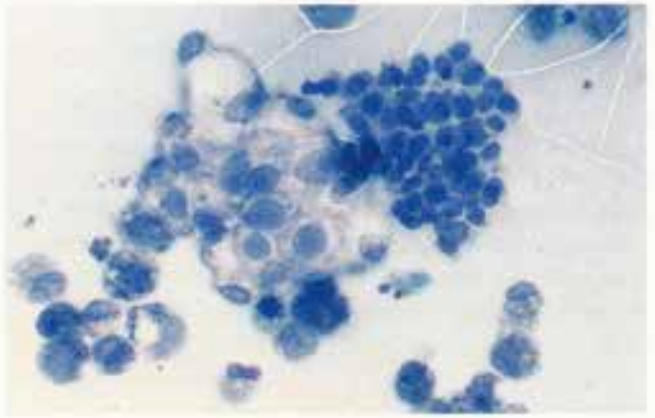


Figura 7 - Cane, neof. mammaria, FNAB, Giemsa. 400 x
Gruppo di cellule carcinomatose con marcati aspetti di sdifferenziazione (sinistra) in vicinanza di cellule poco sdifferenziate (destra).

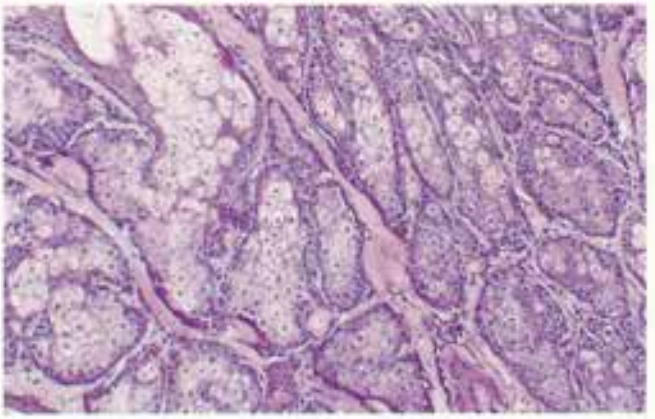


Figura 8 - Cane, neof. cutanea, sezione criostatica, E.E. 200 x
È rilevabile l'ottima definizione istologica di questo preparato criostatico in un caso di adenoma sebaceo.

le già documentate in letteratura ed in particolare è stata raggiunta un'accuratezza diagnostica superiore al 90% (11,23) (figura 8).

Tralasciando le modalità di esclusivo interesse chirurgico, che prevedono l'uso del bisturi, le numerose tecniche bioptiche descritte in bibliografia possono essere schematicamente divise nei seguenti gruppi: biopsie con ago; biopsie con *punch*; biopsie con trapano; biopsie con pinza, biopsie perendoscopiche.

Biopsie con ago

Ago tru-cut

Tale ago è costituito da una cannula con una estremità a margini taglienti, al cui interno scorre un mandrino dotato di una doccia raccogli-campione (figura 9). Le misure dell'ago variano da 14 a 21 *gauge* per il diametro e da 75 a 500 mm per la lunghezza. Dopo aver introdotto lo strumento nella sede di lesione (con il mandrino estratto) si sospinge in avanti la cannula con un deciso e rapido movimento di "a fondo" al fine di intrappolare nella doccia raccogli-campione un frammento di tessuto. Quindi si retrae l'ago dalla lesione e si pone il campione bioptico in un liquido fissativo per essere oggetto delle usuali ricerche istologiche (1,21).

Ago di Vim-Silverman modificato da Franklin

È costituito da una cannula al cui interno scorre un mandrino bivalve, tagliente ed appuntito, che si divarica nelle due componenti quando viene portato all'esterno (figura 10). Introdotto l'ago nella sede prescelta, si fa avanzare il mandrino e lo si ruota alcune volte in senso orario ed antiorario. Quindi si sospinge in avanti la cannula che, determinando la chiusura delle due valve, permette il prelievo del campione bioptico che viene processato secondo il normale criterio istopatologico (12,14).

Ago di Menghini

È formato da un semplice ago con punta tagliente e con un limitatore di profondità cui viene applicata una siringa. Con tale strumento, a seconda delle sue dimensioni, è possibile prelevare campioni bioptici o citologici (4,7).

Le tre modalità di prelievo bioptico fin qui descritte sono accomunate dal pregio di provocare solo una modesta emorragia nel punto di entrata dell'ago, facilmente controllabile tramite una leggera pressione digitale, e di non richiedere punti di sutura. Sono altresì interscambiabili, anche se l'ago di Vim-Silverman mod. Franklin viene preferito per le biopsie renali e l'ago di Menghini per quelle epatiche.

Il limite maggiore delle tre tecniche risiede nel fatto che il campione di tessuto prelevato è di piccole dimensioni, per cui, se la lesione è a sua volta di dimensioni contenute, si rischia di ottenere campioni non significativi ai fini diagnostici. Peraltro, nel caso di prelievi correttamente eseguiti, l'accuratezza diagnostica risulta sovrapponibile a quella dei tradizionali preparati istopatologici (figura 11).

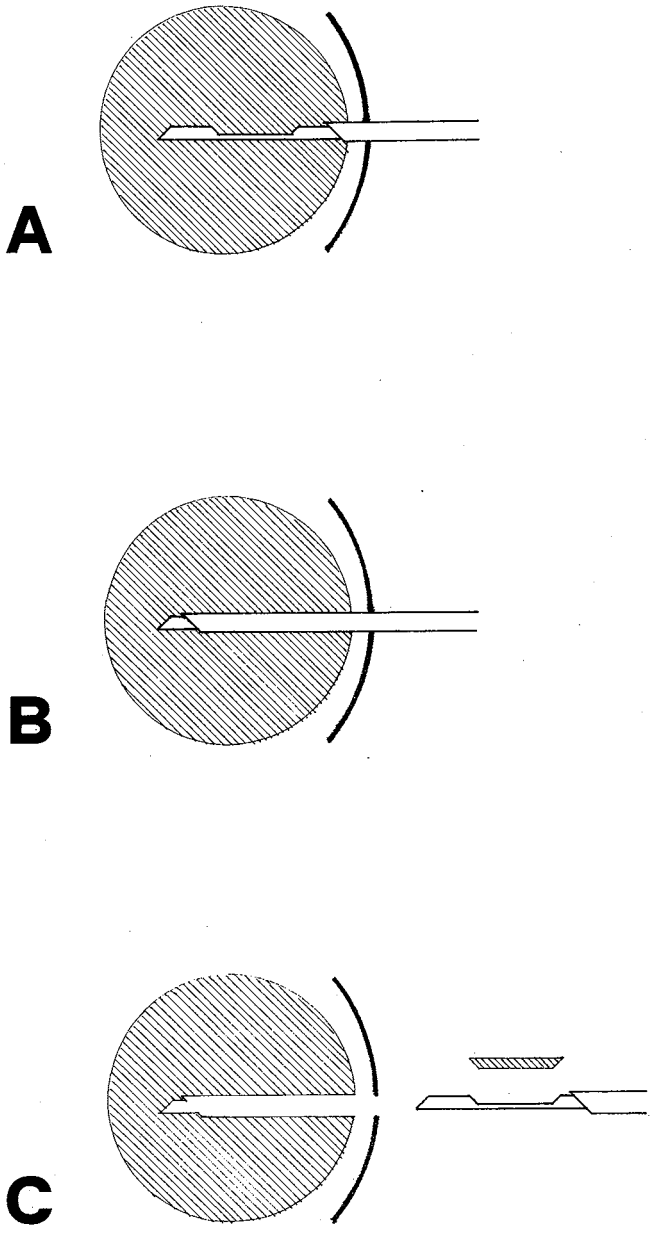


Figura 9 - **Modalità di prelievo bioptico con ago *tru-cut*.**

Biopsie con *punch*

Il punteruolo da biopsia (*punch*), che è disponibile in diversi modelli, è costituito da un cilindro con un'estremità a margini taglienti il cui diametro varia da 4 a 8 mm. Lo strumento, che è destinato quasi esclusivamente a biopsie cutanee, viene applicato in corrispondenza della sede prescelta ed infisso con un

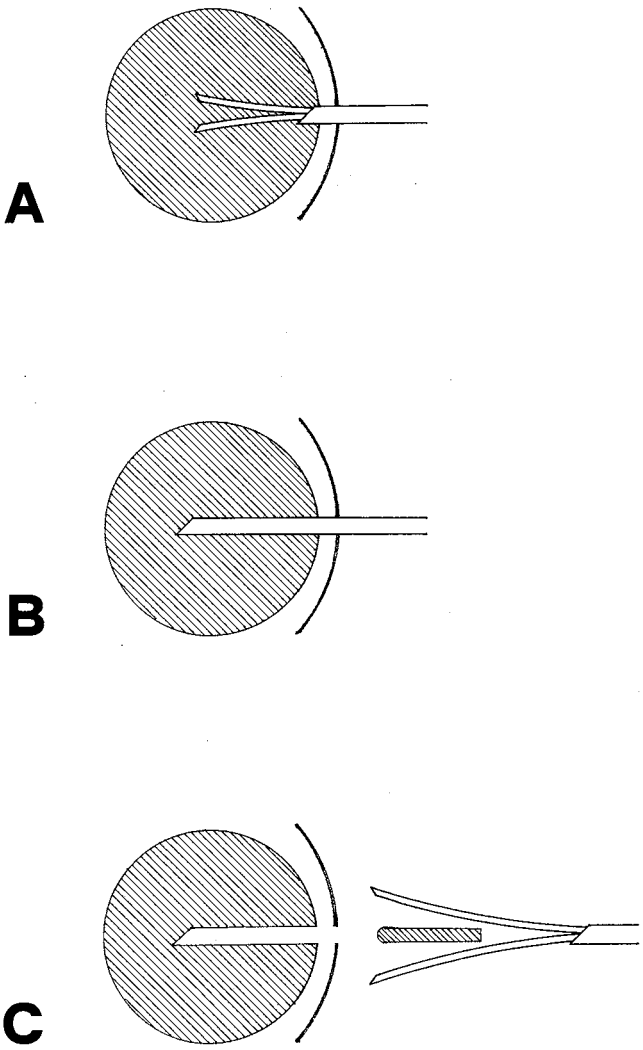


Figura 10 - **Modalità di prelievo bioptico con ago Vim-Silverman mod. Franklin.**

movimento rotatorio. Quindi lo si retrae e si asporta il campione di tessuto incidendolo alla base per mezzo di forbici (28) (figura 12). Talora è necessario applicare qualche punto di sutura per chiudere la breccia cutanea, soprattutto se si è fatto uso di punteruoli di grosso calibro.

Biopsie con trapano

La biopsia con trapano viene effettuata esclusivamente in caso di lesioni del tessuto osseo.

Si utilizza il trapano di Michelle che è costituito da un cilindro appuntito e da un mandrino con un'estremità seghettata. Dopo adeguata anestesia generale, è necessario incidere la cute ed i piani muscolari sottostanti fino a raggiungere il tessuto osseo. Si introduce quindi il trapano nella breccia operatoria e si pre-

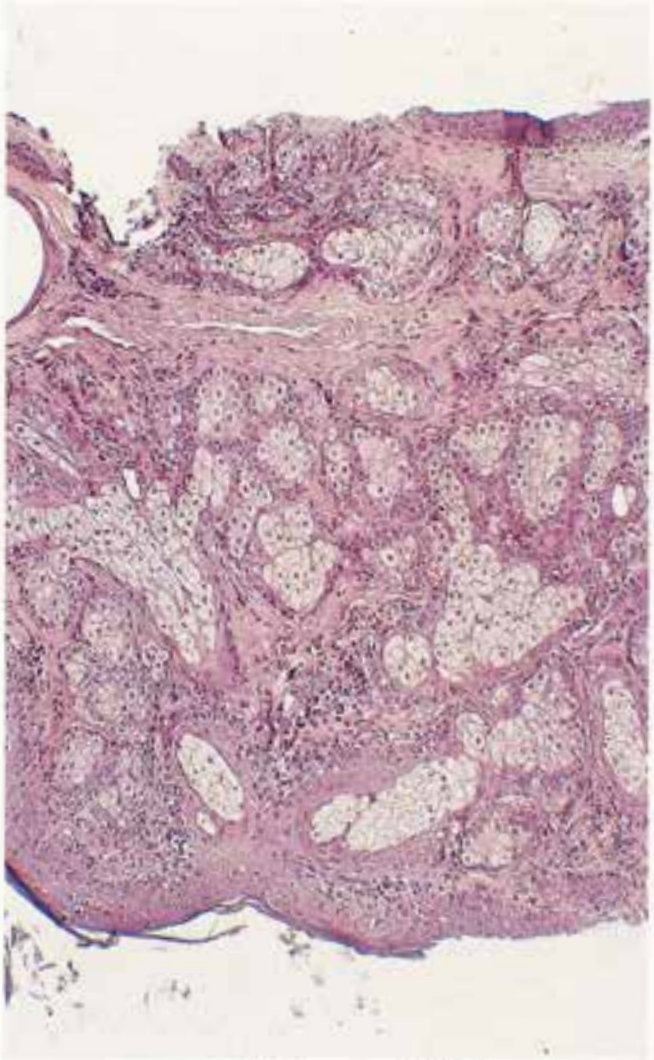


Figura 11 - **Cane, neof. cutanea, biopsia con ago *tru-cut*, E.E. 100 x Sono valutabili le dimensioni del prelievo con ago *tru-cut* nello stesso caso della figura 8.**

leva un campione delle dimensioni di 1-3 mm, isolandolo dal tessuto circostante grazie alla rotazione della punta dello strumento in varie direzioni. Il materiale bioptico viene poi delicatamente raccolto con il mandrino e sottoposto agli usuali processi di fissazione e colorazione.

Recentemente è stato introdotto nella pratica clinica l'uso dell'ago di Jamshidi che presenta notevoli vantaggi rispetto all'ago di Michelle, tra i quali la diminuzione dei casi di distorsione cellulare e del rischio di fratture patologiche causate dall'azione meccanica del trapano (18).

Biopsie con pinza

Lo studio della patologia uterina, tramite l'esame istologico di campioni bioptici, riveste una certa importanza in medicina veterinaria soprattutto nelle specie bovina ed equina (3). In tali specie, frammenti di endometrio sono raccolti grazie all'utilizzo di apposite pinze bivalvi introdotte per via vaginale. In recen-

Figura 12 - **Modalità di prelievo bioptico con punch.**

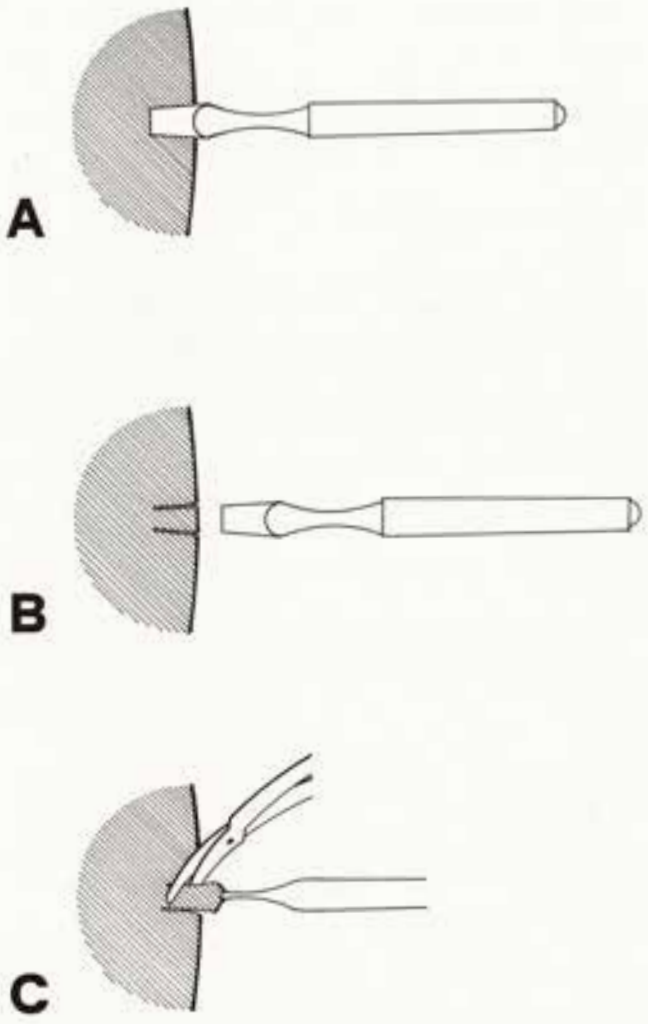
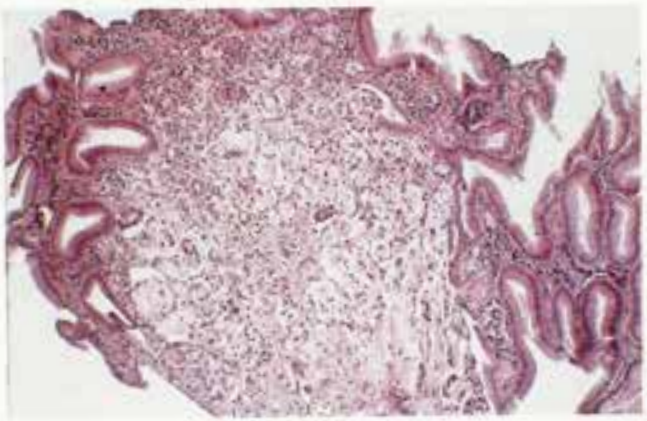


Figura 13 - **Cane, stomaco, biopsia perendoscopica, E.E. 100x Nonostante le piccole dimensioni del prelievo risulta agevole la diagnosi di adenocarcinoma mucinoso.**



ti lavori condotti negli USA (5,6) è stata dimostrata una stretta correlazione tra lesioni endometriali, riscontrate su prelievi bioptici ottenuti con pinza, ed infertilità. L'esame istologico di biopsie endometriali può essere quindi considerato, oltre che un valido mezzo diagnostico, anche un utile approccio prognostico nei riguardi della gravidanza.

Biopsie perendoscopiche

Frammenti di tessuto, atti ad essere processati secondo le usuali tecniche istologiche, possono essere raccolti con l'utilizzo di pinze da biopsia collegate ad apparecchi a fibre ottiche per endoscopia. Con tale procedura è possibile ottenere campioni bioptici dalle porzioni anteriori (esofago, stomaco, duodeno) e posteriori (grosso intestino) del tubo gastroenterico (25) e da diverse zone del tratto respiratorio (cavità nasali, laringe, trachea, bronchi). Una ricerca condotta su un'ampia casistica di biopsie perendoscopiche gastriche ed intestinali (26,27) ha confermato l'ottima affidabilità diagnostica di tale metodo, sebbene sia da sottolineare il fatto che, in una certa percentuale dei casi (intorno al 10%), i prelievi sono risultati inadatti all'esame istologico. Un altro limite da tenere nella giusta considerazione è che tale tipo di prelievo è piuttosto superficiale, interessando generalmente solo la mucosa.

Su 11 neoplasie gastriche canine da noi recentemente studiate, 7 sono state diagnosticate tramite l'esame istologico di prelievi perendoscopici (24) (figura 13).

Conclusioni

Appare chiaro, alla luce di quanto sopra riportato, come attualmente il veterinario pratico possa disporre di una vasta gamma di strumenti e relative tecniche atte ad ottenere biopsie.

Ognuna di tali tecniche possiede precisi campi applicativi così come vantaggi e limiti; questi ultimi devono essere ben presenti al clinico, all'atto del prelievo, ed al patologo, al momento dell'interpretazione dei preparati. Per tale motivo è auspicabile soprattutto nelle prime esperienze applicative, una stretta collaborazione tra i due operatori.

In conclusione ci sembra opportuno, anche per la medicina veterinaria, ribadire l'utilità delle tecniche di biopsia cito-istologica che rappresentano, in molti casi, una risposta semplice, economica e precisa ad essenziali quesiti diagnostici e prognostici.

Ringraziamenti

Si ringrazia vivamente Angela Moccia per l'eccellente realizzazione grafica degli schemi.

BIBLIOGRAFIA

1) BAYLY W.M., PARADIS M.R., REED S.M. (1980): Equine renal biopsy: indications, technic, interpretation and complication. Mod. Vet. Pract., *61*, 763-768.
2) BERG J.W., ROBBINS G.F. (1962): A late look at the safety of aspiration biopsy. Cancer, *15*, 826-827.
3) BIOLATTI B., PAU S., VALPREDA M., ANDRUETTO S., GUARDA F. (1984): Indagini sull'ipofertilità bovina: limiti e possibilità diagnostiche della biopsia e dello striscio uterino correlati all'esame batteriologico ed all'esame anatomo-patologico. Rivista di Zootecnica e Veterinaria, *12*, 109-116.
4) BROVIDA C., CANESE M.G. (1985): La biopsia renale nel gatto. Boll. Ass. It. Vet. Picc. An., *24*, 91-98.
5) CONCHA-BERMEJILLO A.DE LA, KENNEDY P.C. (1982): Prognostic value of endometrial biopsy in the mare: a retrospective analysis. J.A.V.M.A., *181*, 680-681.
6) DOIG P.A., MC KNIGHT J.D., MILLER R.B. (1981): The use of endometrial biopsy in the infertile mare. Can. Vet. J., *22*, 72-76.
7) DOUGLAS A.P., KEER D.N.S. (1968): Renal biopsy. In READ A.E. (Ed.): Biopsy procedures in clinical medicin. Wright & Sons Lmt., Bristol.
8) DUNCAN J.R., PRASSE K.W. (1979): Cytology of canine cutaneous round cell tumours. Mast cell tumours, histiocytoma, lymphosarcoma and trasmissible venereal. Vet. Pathol. *16*, 673-679.
9) FOX C.H. (1979): Innovation in medical diagnosis. The scandinavian curiosity. The Lancet, June, 30.
10) FRANZEN S., ZAJICEK J. (1968): Aspiration biopsy in diagnosis of palpable lesions of the breast. Acta Radiol., *7*, 241-262.
11) GAGNONE G. (1984-85): Valutazione comparativa di tecniche istologiche finalizzate alla diagnostica rapida in patologia veterinaria. Tesi di laurea, Ist. An. Pat. Vet. e Pat. Av., Fac. Med. Vet., Università di Milano.
12) GOLDSTON R.T., WILKES R.D., SEYBOLD I.M. (1983): Biopsy techniques. Vet. Med. & Small An. Cl., *78*, 495-498.
13) GRIFFITHS G.L., LUMSDEN J.H., VALLI E.O. (1984): Fine needle aspiration cytology and histologic correlation in canine tumours. Vet. Clin. Pathol., *13*, 13-17.
14) JERAJ K., OSBORNE C.A., STEVENS J.B. (1982): Evaluation of renal biopsy in 197 dogs and cats. J.A.V.M.A., *181*, 367-369.
15) MENARD M., FONTAINE M., MORIN M. (1986): Fine meedle aspiration biopsy of malignant tumours in dogs and cats: a report of 102 cases. Can. Vet. J., *27*, 504-510.
16) MILLS J.N., GRIFFITHS G.L. (1984): The accuracy of clinical diagnosis by fine needle aspiration cytology. Aust. Vet. J., *61*, 269-271.
17) NAVA G.A., CAIROLI F. (1986): La verità al microscopio. Scienza Veterinaria, *5*, 19-25.
18) POWERS B.E., LARUE S.M., WITHROW S.J., STAW R.C., RICHTER S.L. (1988): Jamshidi needle biopsy for diagnosis of bone lesions in small animal. J.A.V.M.A., *193*, 205-210.
19) RAVETTO C. (1988): Citologia urinaria. In SPANDRIO L.(Ed.): Manuale di laboratorio, vol. 3, Piccin Editore, Padova.
20) REBAR A.H., DE NICOLA D.B., MUGGENBURG B.A. (1980): Bronchopulmonary lavage cytology in the dog: normal findings. Vet. Pathol., *17*, 294-304.
21) RICHARDSON R.C. (1985): Tecniche di biopsia. Atti del 1° Incontro d'Aggiornamento Permanente dei Veterinari per Animali da Compagnia. Salsomaggiore Terme.
22) ROSZEL J.F. (1981): Cytologic procedures. J.A.A.H.A., *17*, 903-910.
23) ROVETTA G. (1987-88): Valutazione comparativa di alcune tecniche citologiche ed istologiche nella diagnosi delle neoplasie cutanee animali. Tesi di Laurea, Ist.An. Pat. Vet. e Pat. Av., Fac. Med. Vet., Università di Milano.
24) SCANZIANI E., FONDA D., GUALTIERI M. (1988): Gastric carcinoma in the dog; study of 11 cases. Nineth Autumn Meeting, European Society of Veterinary Pathology, San Remo, in corso di stampa.
25) SIMOSON J.W., ELSE R.W. (1987): Diagnostic value of tissue biopsy in gastrointestinal and liver diseases. Vet. Rec., *120*, 230-233.

26) VAN DER GAAG I. (1988): The histological appearance of peroral gastric biopsies in clinically healthy and vomiting dogs. Can. J. Vet. Res., *52*, 67-74.
27) VAN DER GAAG I. (1988): The histological appearance of large intestinal biopsies in dogs with clinical signs of large bowel disease. Can. J. Vet. Res., *52*, 75-82.
28) WITHROW S.L., LOWES N. (1981): Biopsy techniques for use in small animal oncology. J.A.A.H.A., *17*, 889-902.

Castagnaro M.
Dipartimento di Patologia Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria
Università di Torino

Nuove metodiche diagnostiche in Anatomia patologica veterinaria

Introduzione

È noto come uno degli scopi principali dell'Anatomia patologica - scienza eminentemente applicativa- sia **la diagnosi dei diversi processi morbosi** attraverso i mezzi ed i metodi di sua competenza.

Da questo punto di vista quindi le nuove frontiere della diagnostica corrispondono, per una certa parte, alle nuove conoscenze raggiunte nel campo dell'Anatomia patologica. Raramente infatti vi sono fasi dell'attività medico-veterinaria che si sottraggono al contributo di questa disciplina.

Sotto questo profilo, possiamo osservare come l'Anatomia patologica abbia subìto negli ultimi anni, in relazione ai nuovi mezzi di indagine, una evoluzione rapidissima e, di conseguenza, la figura del patologo è profondamente mutata rispetto al passato anche recente.

Infatti l'intenso, rapido e profondo sviluppo delle conoscenze biomediche, la comparsa di nuove malattie, il sorgere di nuovi settori di ricerca prima inesistenti, l'introduzione di nuove tecnologie, l'esigenza di raccogliere sistematicamente i dati di osservazione per una analisi corretta con metodi statistici, hanno modificato profondamente la fisionomia dottrinaria e pratica della Medicina Veterinaria ponendo i cultori della Patologia nella necessità di affrontare con nuovi mezzi e soprattutto con una mentalità più moderna i problemi relativi alla comprensione e alla diagnosi della malattie degli animali anche dal punto di vista comparato rispetto all'uomo.

Occorre però tener presente che le più moderne e specialistiche tecniche diagnostiche sono delle appendici non dissociabili dai mezzi di indagine classici rappresentati dall'esame anatomo-patologico macroscopico e dall'istopatologia. Non ha infatti alcun senso eseguire sofisticate indagini senza aver prima sottoposto il materiale patologico a queste due primarie e basilari tecniche anatomo-patologiche.

In ogni caso la morfologia macroscopica, istopatologica, istochimica e ultrastrutturale, devono essere un mezzo strumentale per interpretare e chiarire **le caratteristiche fisiopatologiche delle alterazioni** osservate, rappresentando quindi una chiave di lettura del cammino svolto dalle lesioni.

È di questo che il veterinario deve servirsi per meglio comprendere la natura, il significato e l'evoluzione delle malattie.

Fatte queste debite premesse possiamo quindi affermare che le più moderne tecniche diagnostiche nel campo dell'Anatomia patologica si rifanno a tre grandi settori: l'**istochimica**, l'**immunoistochimica** e, secondariamente, la **microscopia elettronica.**

Prima però di affrontare l'argomento nei suoi aspetti più moderni, descriviamo brevemente attraverso quali vie si giunge all'uso delle tecniche sopra elencate.

Una schematizzazione dell'*iter* diagnostico a cui viene sottoposto il materiale da esaminare viene proposto in tabella 1. Ognuna delle fasi schematizzate può rappresentare uno stadio diagnostico definitivo oppure la possibilità di indirizzare l'anatomo-patologo verso tecniche più appropriate.

Infine, un discorso tutto particolare dovrebbe essere affrontato sullo studio, attraverso ogni tipo di tecnica a disposizione, dei campioni bioptici. In considerazione delle sue peculiari caratteristiche, infatti, esso deve essere visto come un ulteriore strumento, assieme ai vari esami clinici e di laboratorio, in possesso del clinico per la comprensione, la prognosi e la terapia della malattia.

Non ci dilungheremo ulteriormente su questo argomento, che sarà sviluppato da un'altra relazione, e ci addentriamo invece nelle tecniche diagnostiche classiche.

Tecniche diagnostiche come *screening* di base

a) Esame macroscopico

L'esame anatomo-patologico macroscopico riveste ancora sempre un'importanza fondamentale nell'identificazione dell'**organo bersaglio** (esempi tipici ed attuali sono rappresentati dallo **struma tiroideo** provocato dai tiouracilici e dai ditiocarbammati nel bovino e nel pollo (1) (figura 1), oppure dall'**idrometra** e **mucometra** che si possono riscontrare a seguito di prolungata stimolazione estrogenica nei bovini(2,3) e, in sede di ispezione alla macellazione, quale strumento di **rilevazione epidemiologica di massa.**

In casi particolari questa tecnica può già consentire una diagnosi definitiva.

b) Esame istologico classico

L'istopatologia classica è il secondo ed essenziale passo verso la diagnosi e la prognosi dei diversi processi morbosi.

Essa rappresenta ancora oggi uno strumento di diagnosi eziologica semplice e estremamente efficace in numerosissimi fenomeni patologici quali le **infiammazioni granulomatose** (figura 2), alcune **malattie virali** (corpi inclusi), **malattie protozoarie**, e **malattie micotiche**. Ancora, nell'oncologia l'esame istopatologico è essenziale per la classificazione nosologica del processo neoplastico, per la prognosi ed una eventuale terapia.

Tuttavia anche quando il suo contributo alla diagnosi del processo patologico non è sufficientemente chiaro e discriminante, l'esame istopatologico riveste notevole importanza nell'indirizzare la scelta per l'uso di altre tecniche disponibili, allo scopo di arrivare ad una diagnosi precisa. Ancora, la recente messa a punto di nuovi materiali plastici, utilizzabili per l'inclusione dei tessuti, ha permesso di eseguire sezioni molto più sottili di quelle ottenibili con le comuni inclusioni in paraffina. Infatti l'uso di resine quali il metil-metacrilato e il glicol-metacrilato permette oggi di eseguire l'**esame istopatologico su sezioni se-**

mifini (anche inferiore al micron di spessore) che aumenta enormemente il potere di risoluzione e la possibilità quindi di osservare dettagli altrimenti difficilmente visibili o addirittura non percepibili (4).

c) Esame citologico

L'esame citologico rappresenta un ausilio diagnostico utile, semplice ed economico, in numerosi stati patologici. Inoltre, può essere facilmente eseguito dal veterinario pratico in qualsiasi condizione.

Nella nostra esperienza, l'esame citologico su aspirato con ago sottile o su secrezione della ghiandola mammaria (figura 3) in condizioni normali e patologiche riveste un'enorme importanza nella diagnosi, nella prognosi dei soggetti portatori di neoplasia e nel controllo delle recidive (5,6).

Tecniche istochimiche

I metodi di colorazione dei tessuti comunemente utilizzati dall'istopatologia classica non possono dare precise informazioni circa la natura chimica delle sostanze presenti nei tessuti. Le tecniche istochimiche sono state quindi approntate per ottenere dettagli sempre più precisi, sfruttabili dal punto di vista diagnostico, sulla composizione biochimica delle componenti tissutali.

Ciò avviene sottoponendo i tessuti interessati a delle vere e proprie reazioni chimiche, che danno luogo a prodotti colorati, non diffusibili.

Secondo quanto schematizzato in tabella 1, abbiamo approssimativamente suddiviso le tecniche istochimiche modernamente utilizzate in patologia, secondo le reazioni biochimiche che sfruttano e secondo le sostanze che mettono in evidenza, in tre grosse categorie:

a) Tecniche istochimiche classiche: conosciute da moltissimo tempo, mettono in evidenza, spesso purtroppo in modo poco specifico, vaste categorie di composti biochimici (proteine,lipidi, glicoconiugati vari, acidi nucleici, ecc). Tuttavia, talvolta queste tecniche si presentano ancora come un essenziale mezzo diagnostico, come nei casi ad esempio della colorazione Rosso Congo per la **sostanza amiloide** e dei vari metodi di **identificazione dei lipidi e delle lipofucsine.**

b) Tecniche istochimiche enzimatiche: consistono essenzialmente nella rivelazione dell'attività enzimatica incubando il preparato in esame, al pH e alla temperatura ottimale in una soluzione di un substrato specifico.

Sotto l'azione dell'enzima poi, tale substrato genera dei prodotti, colorati o suscettibili di essere colorati, non diffusibili (7).

Questi metodi vengono comunemente utilizzati per l'identificazione di cellule che esprimono selettivamente, o più intensamente di altre, una specifica attività enzimatica. Come esempio dell'utilizzo diagnostico di queste tecniche enzimatiche possiamo riportare i risultati ottenuti nell'ambito di uno studio condotto presso il nostro Dipartimento, volto a mettere in evidenza le **alterazioni timiche** indotte dalla somministrazione a scopo fraudolento di glicocorticoidi nella specie bovina (8).

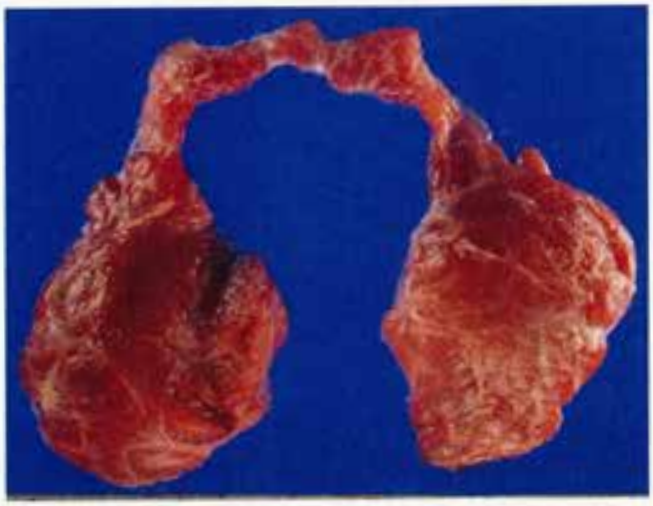


Figura 1- **Bovino, struma tiroideo di tipo parenchimatoso.**

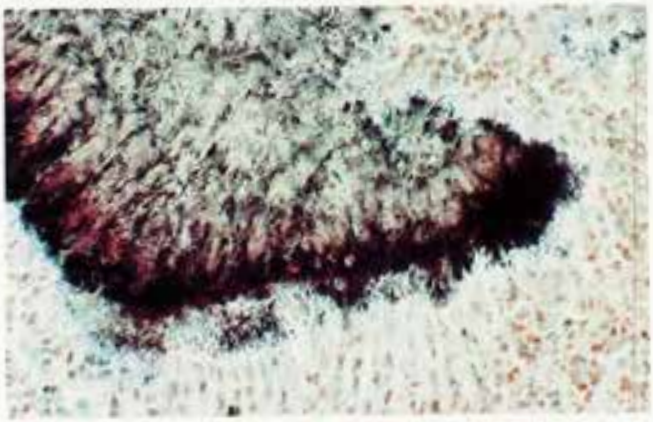


Figura 2 - **Bovino, sezione di seno mascellare colorata con il metodo Grocott: medio ingrandimento. Sono facilmente riconoscibili le druse e le clave (colorate in scuro), tipiche dei granulomi da actinomicosi.**

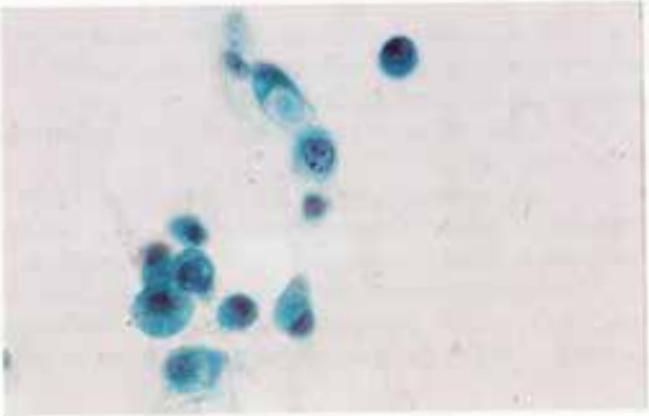
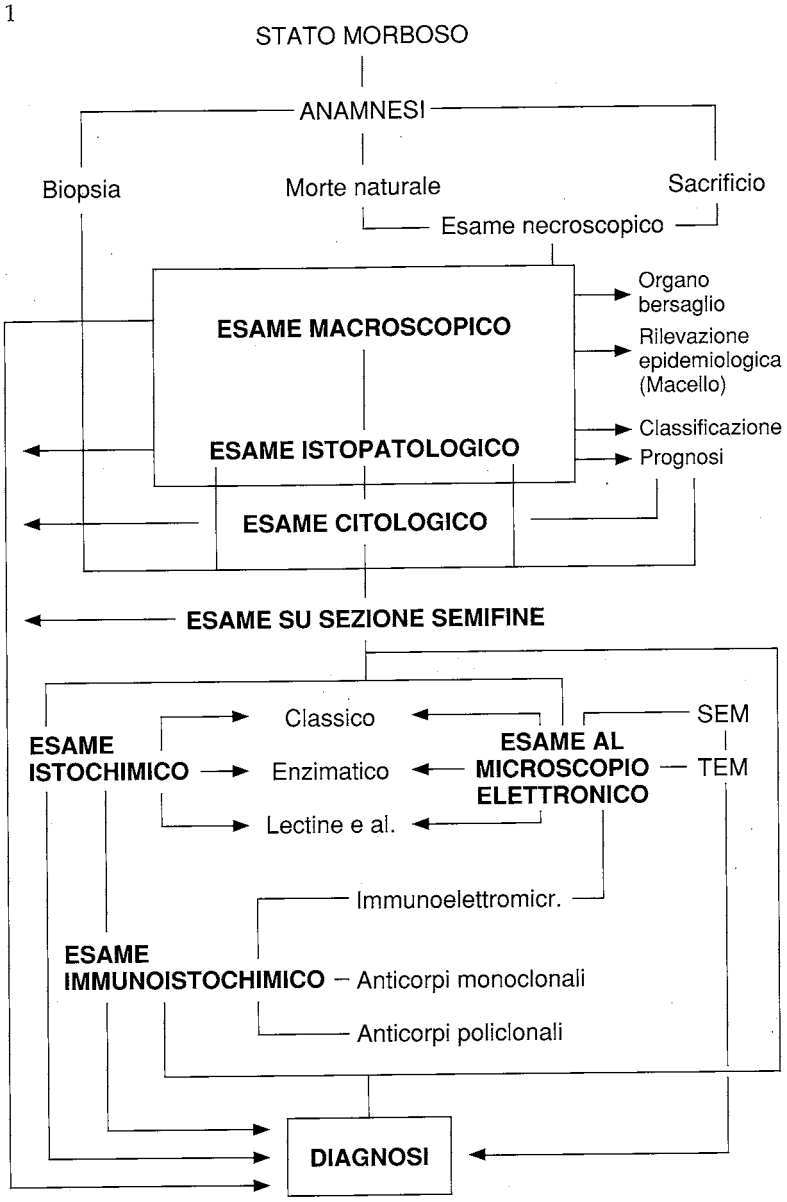


Figura 3 - **Striscio citolo-gico di carcinoma mammario di cane: colorazione Papanicolau.**

Tabella 1



Allo scopo, abbiamo sottoposto sezioni di timo prelevate da animali trattati sperimentalmente con desametasone-21-isonicotinato, alle reazioni per l'attività dell'alfa-naftil-acetato-esterasi (ANAE), della beta-glucuronidasi (BG), della fosfatasi acida (FA), della diamino-peptidasi IV (DAP IV), della adenosintrifosfatasi (ATPasi) e della 5-nucleotidasi (5-Nasi).

La finalità dell'applicazione di tali reazioni è la messa in evidenza delle alterazioni indotte dai glicocorticoidi a carico delle sottopopolazioni linfocitarie della linea T.

Attraverso l'uso di queste tecniche si è osservata una notevole deplezione linfocitaria corticale a carico del timo che interessava in modo particolare i timociti BG+. Tale deplezione era accompagnata da un incremento della popolazione monocitico/macrofagica, ANAE+, BG+, FA+ e DAP IV+. Dopo quattro settimane dalla sospensione del trattamento con glicocorticoidi, sebbene con le comuni tecniche istopatologiche il timo si presentasse normale, la popolazione di timociti BG+ permaneva notevolmente al di sotto dei valori di controllo (10% dei timociti corticali contro il 35% dei controlli). Dal momento che l'impiego dei glicocorticoidi maggiormente utilizzati a scopo fraudolento prevede la loro sospensione all'incirca quattro settimane prima della macellazione, l'andamento della popolazione timica BG+ può assumere un notevole significato diagnostico nella valutazione di questa frode.

c) Nuovi tipi di localizzazione istochimica - Tecnica istochimica delle lectine. Negli ultimi anni sono state messe in evidenza sostanze di diversa origine che possono essere utilizzate, sia a livello istologico sia citologico, per lo studio di specifiche sostanze chimiche presenti in condizioni normali e patologiche. Esse sfruttano la capacità di determinate sostanze di legarsi in modo specifico ai costituenti dei tessuti. Le due più importanti tecniche utilizzate in questo settore sono rappresentate dall'**istochimica delle lectine** e dalle tecniche **di ibridizzazione *in situ*.**

La prima rappresenta una tecnica di studio dei glicoconiugati mentre attraverso la seconda vengono messe in evidenza, direttamente nelle cellule, sequenze specifiche di DNA o di RNA.

In questa sede, per la complessità e la sostanziale mancanza di applicazioni diagnostiche in campo veterinario, non tratteremo la tecnica dell'ibridizzazione *in situ* mentre ci soffermeremo invece sulla tecnica istochimica delle lectine.

Le **lectine** (dal latino *legere* = scegliere) sono sostanze proteiche o glicoproteiche di origine non immunitaria che agglutinano cellule e/o precipitano i glicoconiugati aventi residui specifici di appropriata complementarietà (9).

Esse possiedono almeno due siti di legame per lo zucchero specifico al quale si legano non covalentemente. Furono scoperte nel 1888 da Stillmark il quale per primo riportò che gli estratti di ricino (*Ricinus communis*) agglutinavano eritrociti umani e di altre specie animali. Da allora numerose lectine sono state identificate, purificate e caratterizzate a partire da piante, batteri, funghi, invertebrati e vertebrati. Sebbene la loro funzione negli organismi viventi (lectine endogene) non sia ancora completamente chiara, per la loro capacità di legarsi in modo specifico ai glicoconiugati, le lectine sono state proficuamente utilizzate quali sostanze ad **attività mitogena per i linfociti**, nello **studio dei gruppi sanguigni**, nell'isolamento, purificazione e nella caratterizzazione strutturale delle molecole contenenti carboidrati ed infine per lo **studio istochimico** di molti tessuti ed organi.

Esse vengono classificate in base alla loro affinità per determinati zuccheri in cinque gruppi specifici per: 1) mannosio/glucosio, 2) N-acetilglucosammina, 3) N-acetilgalattosammina/galattoso, 4) L-fucoso e 5) acido sialico.

In tabella 2 sono elencate le lectine normalmente utilizzate nel nostro laboratorio.

Per comprendere correttamente l'uso delle lectine in patologia occorre innanzitutto rifarsi ad alcuni concetti biochimici elementari.

La **glicosilazione** (reazione attraverso la quale vengono aggiunti a una determinata molecola residui monosaccaridici) di proteine e lipidi è uno degli eventi più importanti che interviene prima della loro incorporazione nei diversi compartimenti citoplasmatici oppure della loro secrezione all'esterno della cellula (esempio: mucina, IgA) (10).

Questo particolare processo determina la struttura finale e le proprietà funzionali di glicoproteine, glicolipidi, glicosaminoglicani, comunemente noti come **glicoconiugati** (GC). In particolare, i GC associati alla membrana cellulare (glicocalice) rappresentano strutture critiche nei processi che avvengono sulla superficie cellulare e che si ripercuotono sulla biologia generale della cellula (fenomeni di adesività, legami intercellulari, inibizione della motilità da contatto, controllo della crescita, determinazione antigenica, captazione delle sostanze nutritive, attività recettoriale) (9).

Numerose osservazioni di carattere biochimico sulle alterazioni che si riscontrano a carico dei glicoconiugati nel corso di diversi processi patologici, hanno fornito la base per l'applicazione istochimica delle lectine.

In particolare il loro uso è stato indirizzato nel campo della **diagnostica delle neoplasie** e delle **malattie da accumulo lisosomiale**.

È noto da tempo come la **trasformazione neoplastica** sia associata ad alterazioni delle proprietà di superficie GC-dipendenti, le quali permettono alle cellule neoplastiche di sottrarsi ai normali meccanismi di controllo dell'organismo ed intervengono successivamente nella determinazione della capacità metastatica (11). Le alterazioni dei GC possono riguardare i normali componenti (perdita o aumento della loro concentrazione cellulare, alterata distribuzione) oppure essere caratterizzate dalla presenza di sostanze che normalmente non si ritrovano nelle cellule mature del tessuto da cui il tumore è originato.

Nel nostro Dipartimento stiamo attualmente studiando attraverso questa

Tabella 2 - **Lectine comunemente utilizzate**

Origine	Acronimo	Zucchero specifico
Arachis hypogea	PNA	ß-D-Gal (1-3)-D-GalNAc
Concanavalia ensiformis	Con-A	A-D-man
		a-D-Glc
Dolichos biflorus	DBA	a-D-GalNAc
Glycine max	SBA	a-D-GalNAc
		a-D-Gal
Griffonia simplicifolia	GS-I	a-D-Gal
Lens culinaris	LCA	a-D-man
Lycopersicon esculentum	LEA	ß-D-GlcNAc
Phytolacca americana	PWM	(D-GlcNAc)
Phaseolus vulgaris	PHA	non conosciuta
Ricinus communis	RCA-I	ß-D-Gal
	RCA-II	ß-D-Gal
		D-GalNAc
Triticum vulgaris	WGA	NeuNAc
		(ß-[1-4]-D-GlcNAc)
	SWGA	(ß-[1-4]-D-GlcNAc)
Ulex europaeus	UEA-I	a-L-fucoso

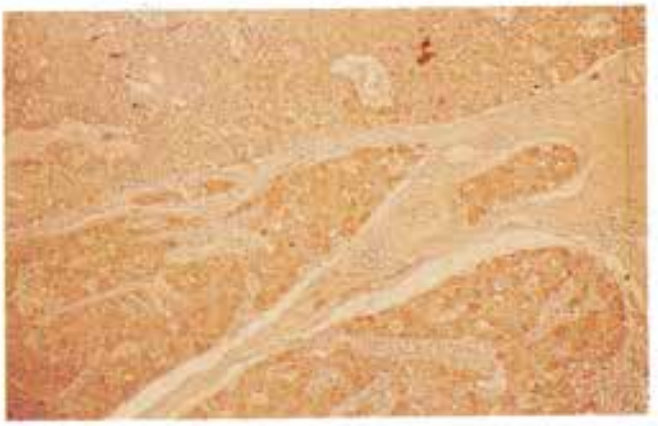


Figura 4 - **Sezione di adenocarcinoma delle ghiandole perianali in un cane maschio incubata con la lectina Con-A: colorazione di contrasto con ematossilina, piccolo ingrandimento.**
Separate da tralci di connettivo sono facilmente osservabili due diverse affinità tintoriali (la reazione positiva è evidenziata dalla colorazione marrone) per la lectina che identificano la presenza di due sottopopolazioni neoplastiche.

particolare tecnica le **neoplasie delle ghiandole perianali e della ghiandola mammaria** del cane.

Nell'ambito delle neoplasie che colpiscono le ghiandole perianali del cane, questa tecnica è stata adottata per cercare di ovviare alla difficoltà di stabilire attraverso l'esame istopatologico il comportamento biologico di questi tumori nonché della loro imprevedibilità nel metastatizzare e dare recidiva.

Risultati preliminari, ottenuti utilizzando un *set* di 12 lectine, hanno permesso di osservare la presenza di sottopopolazioni neoplastiche, Con-A+ e Con-A- (figura 4), nonché una drastica diminuzione del contenuto in acido sialico nelle ghiandole in preda a trasformazione maligna (12). Sono state inoltre messe in evidenza lectine utilizzabili come *marker* di trasformazione benigna (UEA-I, PWM, LCA). Ricerche successive permetteranno di osservare se la presenza e l'estensione delle diverse sottopopolazioni nelle forme carcinomatose possano essere messe in relazione alla diversa capacità metastatica o alla tendenza a formare recidive.

Nell'ambito delle neoplasie mammarie, lo studio iniziato si è rivelato particolarmente interessante per due ordini di motivi:

a) l'identificazione di lectine specifiche per la sola struttura o con una distribuzione selettiva può essere utilizzata per risolvere il problema istogenetico e per la valutazione delle microinvasioni tumorali;

b) la scomparsa, l'attenuazione, il cambiamento della distribuzione della reazione lectinica, oppure, ancora la comparsa di nuovi siti di legame nel tessuto neoplastico, possono permettere di selezionare lectine specifiche rispettivamente per la trasformazione benigna e maligna.

I risultati emersi da questi primi studi (13) hanno messo in evidenza come due lectine (PNA e UEA-I), considerabili come *marker* della funzionalità delle cellule lobulari, nel tessuto patologico presentino con notevole frequenza reazione

positiva nei carcinomi papillari, negativa invece, per i carcinomi solidi. Interessante è, a questo proposito, la segnalazione in medicina umana della stretta correlazione fra ormono-sensibilità di una data neoplasia mammaria e la positività per la lectina PNA. Questo aspetto può avere importantissime ripercussioni terapeutiche.

Altre due lectine (PWM e GS-I), pur non presentando nessun tipo di legame né con le cellule lobulari, né con quelle duttali, sono tuttavia estremamente interessanti in quanto colorano in modo selettivo le cellule endoteliali dei capillari linfatici ed ematici. Per questo possono essere utilizzate per l'**evidenziazione delle micrometastasi.**

Inoltre, applicate ai carcinomi squamosi a diverso grado di differenziazione, entrambe le lectine si sono rivelate estremamente specifiche per questo tipo di neoplasie, rappresentando quindi un potenziale *marker* tumorale.

Le **malattie da accumulo lisosomiale** (MAL) comprendono un gruppo di circa 30 disordini determinati geneticamente che colpiscono sia l'uomo sia gli animali domestici (14), caratterizzati dalla mancata o deficiente attività delle idrolasi acide lisosomiali risultante nell'accumulo intralisosomiale del substrato non catabolizzato.

La diagnosi di queste malattie, oltre che sulla clinica e sull'anamnesi, si basa primariamente sul test biochimico per l'attività enzimatica specifica.

Recentemente, basandosi su osservazioni biochimiche secondo le quali grosse quantità di GC si accumulano nei lisosomi nel corso di alcune MAL, Alroy e coll. hanno iniziato ad utilizzare le lectine per la caratterizzazione istochimica del materiale accumulato (15).

Prendiamo ad esempio il caso dell'oligosaccaride di una glicoproteina di tipo N-legato (tabella 3).

All'interno dei lisosomi, iniziando dalle sue parti esterne (residui terminali), l'oligosaccaride viene demolito in modo sequenziale: ogni enzima specifico è

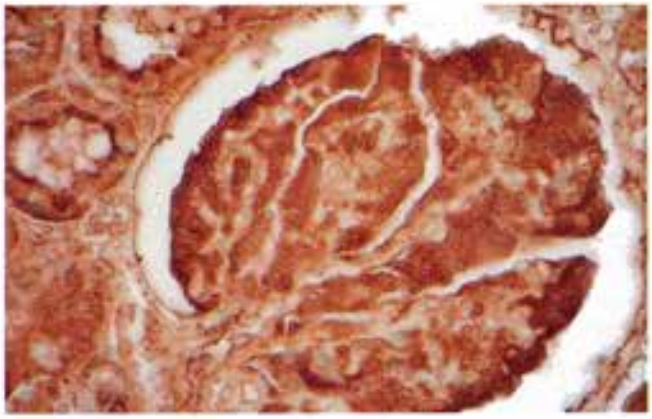
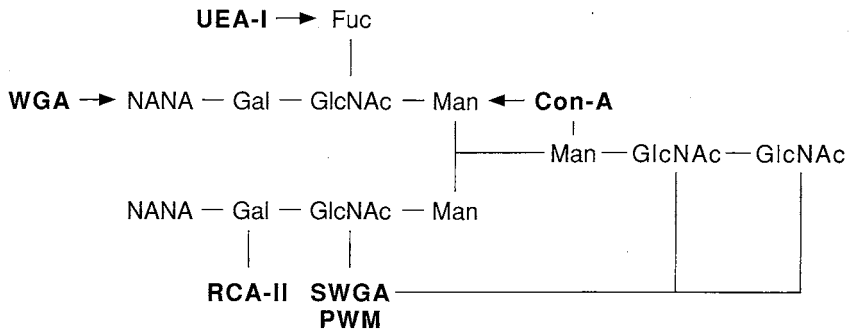


Figura 5 - **Glomerulo renale di un paziente affetto da malattia a cellule I - lectina WGA; colorazione di contrasto con verde di metile, forte ingrandimento.**
Nelle cellule podocitarie fortemente ipertrofiche il materiale accumulato a livello lisosomiale a causa della assente attività delle idrolasi acide presenta una forte positività (colorazione marrone) per la lectina utilizzata.

Tabella 3 - **Schematizzazione delle basi biochimiche per l'utilizzo delle lectine nella diagnosi delle malattie da accumulo lisosomiale**



NANA = acido sialico; Gal = Galattoso; GlcNAc = N-acetilglucosamina ; Man = mannoso; Fuc = fucoso

In tabella è schematizzata la struttura di un oligosaccaride di una glicoproteina N-legata. In relazione alla specifica deficienza enzimatica l'oligosaccaride assumerà una struttura diversa riconosciuta di volta in volta dalla lectina (in grassetto) che presenta affinità per il particolare residuo terminale.

attivo sul substrato solamente se l'enzima precedente ha staccato uno dei residui terminali. Se, per un difetto genetico, l'attività di uno degli enzimi preposti alla sua degradazione viene a mancare oppure è fortemente deficiente, l'oligosaccaride non verrà più degradato e si accumulerà assumendo una struttura tipica in relazione all'enzima mancante.

A questo punto se noi utilizziamo un *set* di lectine in grado di riconoscere ogni residuo di monosaccaride terminale, potremo, in base alla distribuzione della positività, distinguere il tipo di MAL a cui siamo di fronte. In questo modo possiamo diagnosticare in modo specifico e più economico del test enzimatico, le diverse MAL che colpiscono i nostri animali.

Attraverso questo sistema, nel nostro Dipartimento ed in altri laboratori sono stati eseguiti numerosi studi su diversi MAL quali la mannosidosi, la GM1 e GM2 gangliosidosi, la malattia di Niemann-Pick, le mucopolisaccaridosi I e IV e la malattia a cellule I, nell'uomo e nel gatto (figura 5) (16,17).

Infine, possiamo ancora ricordare che con opportune modifiche delle metodiche di fissazione ed inclusione, la tecnica istochimica delle lectine può venire applicata a livello ultrastrutturale con enormi progressi della localizzazione di specifici costituenti cellulari.

Chiudiamo quindi il capitolo dell'applicazione diagnostica della tecnica istochimica delle lectine ed affrontiamo quello dell'immunoistochimica.

Tecniche immunoistochimiche

Per affrontare il più chiaramente possibile il capitolo delle tecniche immunoistochimiche dobbiamo rifarci brevemente ad alcune nozioni elementari di immunologia.

Come è ampiamente noto da tempo uno degli aspetti principali della risposta immunitaria degli organismi animali è la produzione di anticorpi nei con-

fronti di sostanze riconosciute estranee dall'organismo stesso. Queste sostanze vengono chiamate **antigeni** mentre la sequenza dell'antigene (ad esempio, un certo numero di aminoacidi nel caso di una proteina) specificamente riconosciuta dall'anticorpo va sotto il nome di **determinante antigenico** o **epitopo.**

La specificità dell'anticorpo, oltre ad assicurare che le difese dell'organismo reagiscano solamente contro l'agente patogeno e non contro i propri costituenti, può venire utilizzata come strumento per la rivelazione di specifici epitopi presenti nei tessuti in sezioni istologiche preparate allo scopo.

L'utilizzo degli anticorpi per lo studio di determinanti antigenici presenti a livello tissutale rappresenta il grande capitolo dell'immunoistochimica.

Il primo passo per ottenere degli anticorpi specifici nei confronti di un antigene di cui si voglia osservare la localizzazione tissutale, sta nell'iniettare in un animale l'antigene in esame. In questo modo si avrà la formazione di anticorpi che possono essere facilmente ottenuti dal siero dell'animale immunizzato.

Dal momento che l'inoculazione della sostanza (comunemente costituita da più determinanti antigenici) ha provocato una stimolazione di diversi cloni di plasmacellule (ciascuno dei quali è specifico per un solo determinante antigenico), nel siero in esame vi sarà la presenza di diversi tipi anticorpali. In questo caso si otterranno quindi sieri costituiti da **anticorpi policlonali.**

Tuttavia, questa tecnica ha fatto insorgere diversi problemi legati alla possibile presenza nel siero policlonale di anticorpi specifici nei confronti di tutti gli agenti patogeni venuti a contatto con l'animale da esperimento, che potrebbero quindi determinare fenomeni di *cross* -reattività.

Per superare questi ostacoli Kohler e Milstein nel 1975 (18), svilupparono una tecnica-base per la produzione di **anticorpi monoclonali,** che valse loro il Premio Nobel per la Medicina nel 1984.

Senza entrare in dettagli che esulano dalla presente relazione, diremo che la tecnica prevede la fusione di linfociti B e cellule di mieloma (derivanti da tumori delle plasmacellule): in questo modo si ottengono linee cellulari ibride che mantengono le caratteristiche di quelle progenitrici (capacità di secernere immunoglobuline e di crescere continuamente in coltura). Utilizzando per la fusione linfociti B prelevati dall'animale precedentemente stimolato con un antigene noto, avremo la proliferazione di un solo clone cellulare che produce quindi anticorpi verso un solo determinante antigenico.

Infine, con elaborati sistemi di *screening* ampiamente descritti in altri lavori (19), avviene la selezione del clone produttore di anticorpi specifici verso un solo epitopo dell'antigene in questione.

L'avvento degli anticorpi mono- e policlonali e la loro applicazione ha aperto nuove frontiere in numerosissimi settori della ricerca biomedica dove continua ad offrire enormi possibilità di sviluppo delle conoscenze attuali.

In particolare la loro applicazione ha investito numerosi settori di ricerca quali l'immunologia e la patologia, interessando l'attività diagnostica in diversi processi morbosi che vanno dalle **malattie infettive** a quelle **autoimmuni,** dalla **patologia renale** a quella delle **malattie neoplastiche,** dalla **citologia** all'**ultrastruttura.**

Dal momento che lo scopo della presente relazione non è quello di una trattazione sistematica dell'immunoistochimica, daremo solamente alcuni esempi

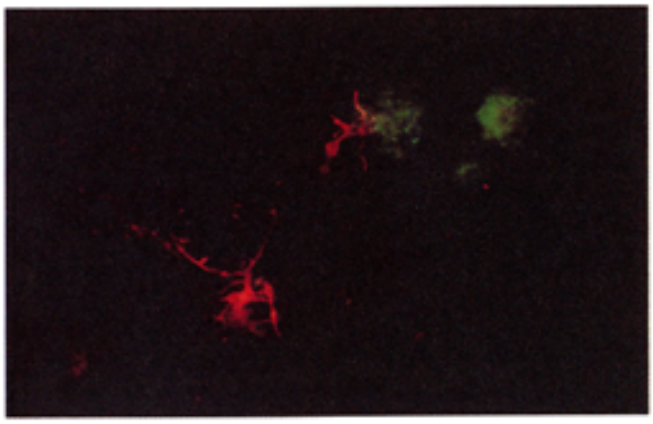


Figura 6 - **Coltura primaria di encefalo di cane. L'anticorpo monoclonale D-110 coniugato con fluoresceina (colorazione verde) evidenzia la presenza dell'antigene virale in un astrocita. Gli oligodendrociti sono invece evidenziati dall'uso dell'MBP (*myelin basic protein*) coniugata con rodamina (colorazione rossa).**

delle più moderne applicazioni diagnostiche degli anticorpi monoclonali in campo medico veterinario utilizzate presso il nostro Dipartimento.

Nel citoplasma delle cellule, oltre ai caratteristici organuli, è presente una struttura fibrillare e tubulare comunemente nota con il nome di **citoscheletro** (tabella 4). Studi biochimici ed ultrastrutturali hanno permesso di identificare tre maggiori sistemi: i microfilamenti, i microtubuli ed i **filamenti intermedi.**

Questi ultimi possono essere sub-classificati in 5 sottoclassi: **citocheratine**, espresse dalle cellule di origine epiteliale; **vimentina**, dimostrata nelle cellule di derivazione mesenchimale e non-epiteliale; **desmina**, presente nelle fibrocellule striate e nella muscolatura liscia; **neurofilamenti** (tre componenti), caratteristici delle cellule neuronali ed, infine, la **proteina gliale acida fibrillare (GFA)**, specifica per gli astrociti ed altre cellule non-neuronali del sistema nervoso (20).

L'osservazione che questi componenti del citoscheletro sono espressi anche nel corso della trasformazione neoplastica delle cellule che li contengono e la successiva disponibilità in commercio di anticorpi mono- e policlonali specifici nei confronti delle cinque sottoclassi di filamenti intermedi, hanno permesso la loro utilizzazione, in associazione all'esame istopatologico classico, nella diagnosi dei **tumori poco differenziati**, nella **individuazione delle micrometastasi** (prevalentemente a livello linfonodale), nella determinazione del tessuto di origine di eventuali metastasi e nell'affronto del problema istogenetico di particolari tipi di neoplasie (tumori mammari del cane) (21).

Ancora, la preparazione di anticorpi specifici per citocheratine di diverso peso molecolare, ha permesso di suddividere i carcinomi poco differenziati in sottoclassi.

Uno schema dell'utilizzazione degli anticorpi per il citoscheletro nella diagnostica oncologica viene proposto in tabella 5.

Infine, nel settore oncologico umano, numerose sostanze derivate o prodotti associati a diverse forme tumorali, quali l'alfa-fetoproteina, l'antigene carci-

Figura 7 - **SNC di cane presentante una sindrome neurologica di tipo subacuto-cronico: materiale fissato in formalina ed incluso in paraffina, D-110 con metodo PAP, medio ingrandimento.**
Nella sostanza bianca è chiaramente evidente la presenza dell'antigene riconosciuto dall'anticorpo D-110 nelle cellule gliali (colorazione marrone).

no-embrionico (CEA), i recettori ormonali (22), subunità della gonadotropina corionica, e noti con il nome di "***marker* tumorali**" vengono comunemente utilizzati nella diagnosi e nel monitoraggio delle malattie neoplastiche.

Come già accennato precedentemente, le tecniche immunoistochimiche sono ampiamente impiegate nella ricerca e nella diagnosi di numerose **malattie infettive** ed **infestive.**

L'elevata disponibilità in commercio e la produzione da parte di numerosi Istituti di anticorpi, prevalentemente monoclonali, ha provocato un enorme impatto nello sviluppo di test diagnostici e nella localizzazione tissutale dei diversi microrganismi.

Nel nostro Dipartimento è stato recentemente sviluppato un anticorpo monoclonale (D-110) specifico nei confronti di una proteina strutturale del virus del **cimurro del cane**.

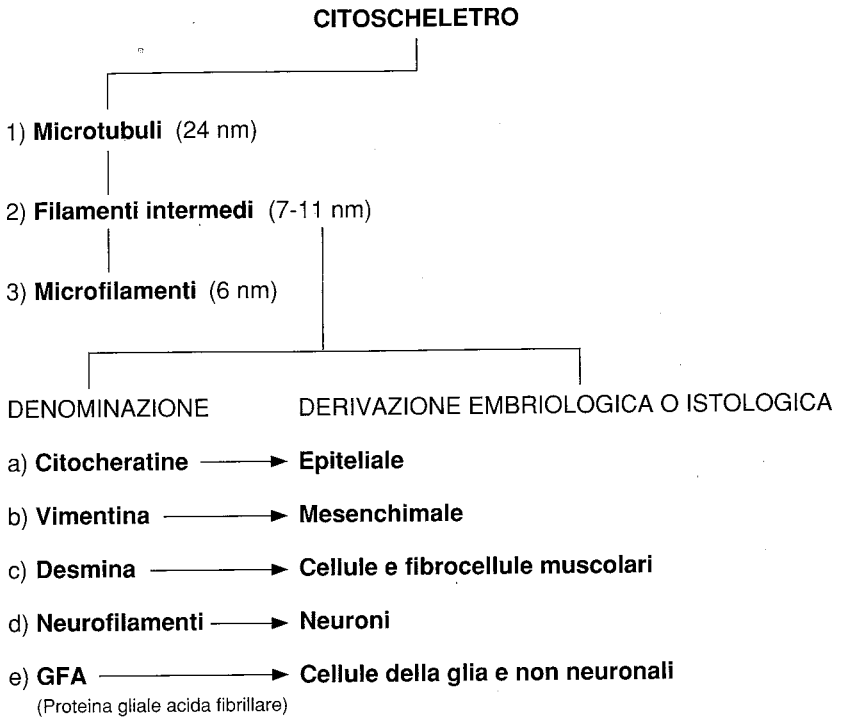
L'anticorpo D-110, oltre ad essere stato utilizzato nello studio della patogenesi delle lesioni encefaliche provocate dal virus (figura 6) (23), viene da noi impiegato nella conferma diagnostica definitiva dei casi sospetti nei quali siano presenti alterazioni istopatologiche riferibili alla malattia (figura 7) (24).

È inoltre attualmente allo studio la possibilità dell'impiego del D-110 su strisci congiuntivali o ematici oppure ancora sulle cellule dell'epitelio di transizione della vescica, presenti nel sedimento urinario, per la diagnosi precoce della malattia.

Allo stesso modo, in diversi Istituti nazionali ed internazionali sono stati prodotti numerosi anticorpi monoclonali nei confronti di IBR, del complesso MD-BVD nel bovino, della malattia di Aujeszky nel suino, della malattia di Borna nel cavallo e di numerose altre malattie virali e batteriche nei diversi animali domestici.

Infine, come già visto per la tecnica istochimica delle lectine, gli anticorpi mono- e policlonali, coniugati con sostanze elettrondense, possono essere utilizza-

Tabella 4 - **Schema della classificazione dei costituenti del citoscheletro con particolare riferimento ai filamenti intermedi.**



ti a livello ultrastrutturale (**immunoelettronmicroscopia**) per una più preci localizzazione dell'antigene da studiare.

Prima di prendere in esame le tecniche ultrastrutturali, ci sembra opportu aggiungere una breve appendice tecnica sulle principali metodiche impieg per la "visualizzazione" delle reazioni immuno-istochimiche e di quelle rigu danti la tecnica istochimica delle lectine.

Come è facilmente immaginabile, una volta che l'anticorpo o la lectina util zati si siano legati al recettore specifico presente nel tessuto in esame, occor rà mettere in evidenza l'avvenuta reazione.

I primi metodi studiati per segnalare questa reazione si basano sulla capa tà di alcune molecole (fluorocromi) di assorbire luce ultravioletta rimettenc la poi nello specchio del visibile (**fluorescenza**). Successivamente, a causa di d ficoltà nell'osservazione morfologica dei tessuti trattati (materiale congela impossibilità all'osservazione delle strutture non positive), sono stati mess punto metodi più idonei per le applicazioni istopatologiche.

Queste tecniche più moderne prevedono l'uso della **perossidasi** (tabella attraverso il metodo **diretto**, **indiretto** e **PAP** (perossidasi-anti-perossidasi)

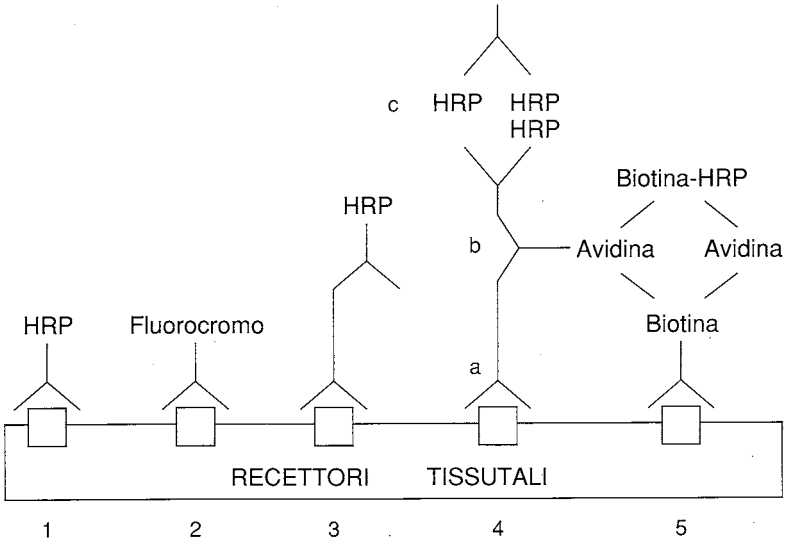
Ancora più recentemente sono state sviluppate tecniche basate sull'affin fra l'avidina e la biotina (**sistema ABC**).

Quest'ultima metodica è particolarmente interessante in quanto aumenta i tevolmente la sensibilità della reazione pur conservandone l'assoluta specifi tà (tabella 6).

Tabella 5 - **Schematizzazione della specificità degli anticorpi anti-filamenti intermedi utilizzabili nella diagnosi delle neoplasie poco differenziate**

Filamenti intermedi	Neoplasie positive
Citocheratine	Carcinomi di diverso tipo Mesotelioma Tumori carcinoidi (?) Timoma Sinovioma
Vimentina	Linfomi Sarcomi Melanoma (S 100) Neoplasie neuronali
Desmina	Rabdomiosarcoma Leiomiosarcoma
Neurofilamenti	Neoplasie neuronali Neuroblastoma (?) Ganglioneuroblastoma Feocromocitoma
GFA	Astrocitoma Ependimoma

Tabella 6 - **Schematizzazione dei diversi metodi immunoistochimici che prevedono l'utilizzo del fluorocromo, della perossidasi (diretta, indiretta, PAP) e del sistema avidina-biotina-perossidasi (ABC)**



1) Metodo diretto con perossidasi
2) Metodo diretto con fluorocromo
3) Metodo indiretto
4) Metodo perossidasi-anti-perossidasi (PAP) (a = anticorpo primario da coniglio, b = anticorpo "ponte" anti-Ig di coniglio, c = complesso PAP).
5) Metodo con biotina e sistema ABC.

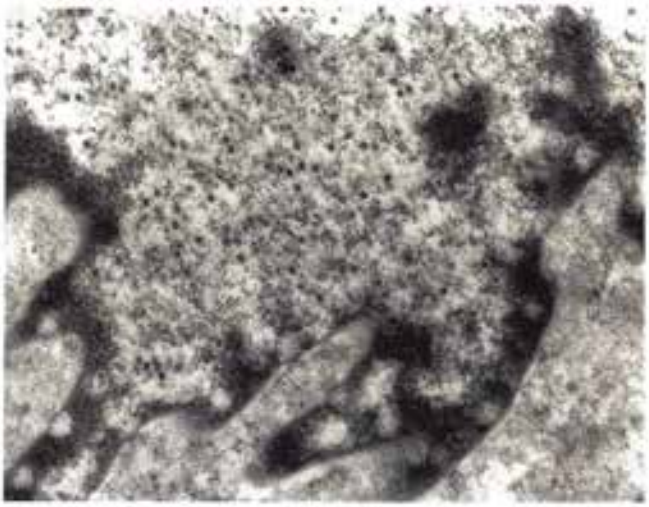


Figura 8 - **Bovino, papilloma cutaneo, TEM, 38.000 x .**
Nel nucleo di questa cellula epiteliale cutanea sono osservabili numerose particelle virali riferibili al virus del papilloma bovino.

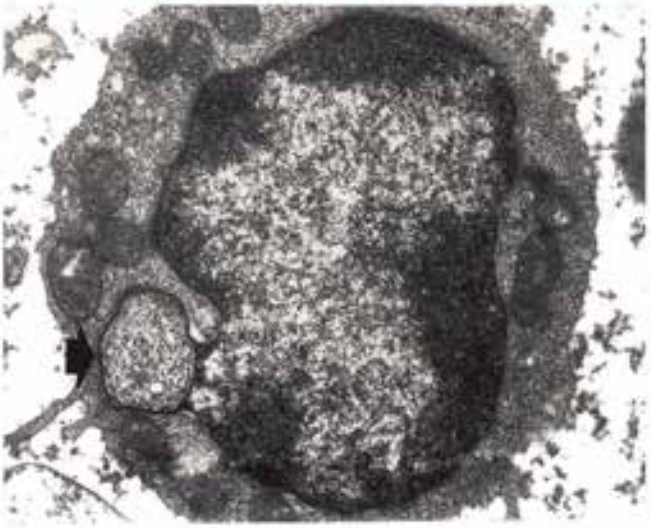


Figura 9 - **Linfocita di bovino nella fase di linfocitosi persistente della leucosi enzootica bovina - TEM, 18.000 x.**
Nel linfocita è possibile osservare la presenza di un *nuclear pocket* (NP) (freccia).

Tecniche ultrastrutturali

L'avvento del primo **microscopio elettronico a trasmissione (TEM)** (1931) e lo sviluppo di numerosissime tecniche applicative, ha portato ad enormi progressi soprattutto nell'osservazione della fine struttura e nella comprensione dei processi patologici di diversa natura (infettivi e non) relativi agli organuli citoplasmatici e del nucleo. La realizzazione più recente del **microscopio elettronico a scansione (SEM)**, ha invece permesso lo studio più accurato, con immagini tridimensionali, delle superfici cellulari e di quei fenomeni e processi morbosi ad essa connessi (strutture intercellulari, processi di adesione degli agenti infettivi, alterazioni di microvilli e strutture cigliari). Mentre una vera e propria applicazione diagnostica del SEM non ha un effettivo riscontro nel campo patologico, le indagini di microscopia elettronica a trasmissione si possono

rendere necessarie ai fini diagnostici più frequentemente.

Tuttavia occorre tener presente che nel campo medico veterinario vi sono alcuni problemi relativi all'utilizzo diagnostico del TEM legati in modo particolare alle elevate spese di gestione delle apparecchiature necessarie, ai relativamente lunghi tempi tecnici di risposta nonché alla necessità di una elevata specializzazione del personale tecnico. Inoltre, non bisogna dimenticare le particolari esigenze relative ai tempi e alle sostanze impiegate nella fissazione del materiale in esame che non sempre, nel nostro settore, possono essere rispettate.

Infine, ricordiamo che alcune delle applicazioni diagnostiche del TEM tendono a venire sostituite dopo l'avvento dell'immuno-istochimica (diagnostica dei tumori). In ogni caso, nonostante quanto detto fino ad ora, per taluni tipi di patologia il TEM rappresenta ancora uno strumento diagnostico indispensabile.

Ad esempio, quando esiste il sospetto diagnostico nei confronti di una determinata **malattia virale, batterica** o **protozoaria** e non sia disponibile l'anticorpo specifico oppure materiale congelato (spesso gli anticorpi non funzionano su tessuti fissati in formalina), è possibile, attraverso l'osservazione ultrastrutturale, la conferma diagnostica (figura 8). Numerosi studi, effettuati su diversi animali, documentano l'utilità della microscopia elettronica in questo settore diagnostico (25,30).

Lo stesso tipo di indagine (quando non siano disponibili ad esempio *marker* immuno-istochimici) può essere effettuata per la **classificazione delle neoplasie poco differenziate** (*marker* ultrastrutturali).

Ancora, in medicina umana, la microscopia elettronica ha contribuito notevolmente alla comprensione dei **processi neoplastici a carico dei leucociti**, fornendo utili informazioni importanti sia in termini classificativi sia diagnostici differenziali.

In campo medico-veterinario, un'applicazione del TEM in questo settore è stata da noi effettuata nella ricerca di *marker* ultrastrutturali indicativi dell'infezione del virus della **leucosi enzootica bovina** . Studi preliminari, su linfociti provenienti da sangue periferico di bovini positivi in diverse condizioni patologiche (infezione cronica asintomatica e linfocitosi persistente) e normali (31), hanno permesso di evidenziare la presenza di alterazioni nucleari riferibili ai tipici *nuclear pocket* (NP) (figura 9). I NP sono delle espansioni laminari della membrana nucleare costituiti da un doppio spazio perinucleare e da una doppia membrana nucleare, contenenti materiale cromatinico.

In particolare si è osservata una stretta correlazione fra la percentuale di positività dei linfociti per i NP e gravità della malattia.

Necessario è l'utilizzo del microscopio elettronico nella **classificazione della patologia glomerulare**, sia per materiale bioptico (32) sia autoptico. Infatti la membrana basale glomerulare ed i processi podali dei podociti nonché gli eventuali immunocomplessi sono generalmente ben preservati anche dopo alcune ore dalla morte dell'animale.

Infine, l'indagine ultrastrutturale risulta di notevole importanza ai fini diagnostici nelle **malattie da accumulo lisosomiale** (figura 10) (vedi paragrafo delle tecniche istochimiche), per le quali la microscopia elettronica rappresenta uno dei primi passi verso la diagnosi definitiva (raggiungibile attraverso elaborate indagini biochimiche) (16,17).

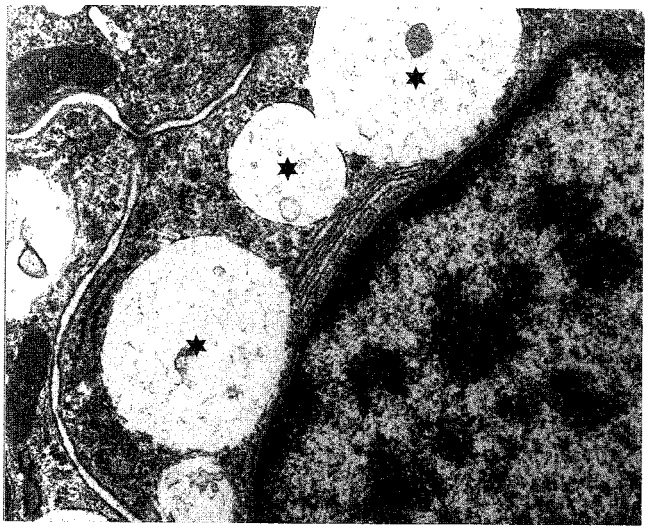


Figura 10 - **Cellula dei tubuli renali di un gatto affetto da mannosidosi - TEM, 29.000 x .**
Nella cellula in esame sono presenti tre grossi lisosomi (stelle) circondati da membrana, contenenti materiale non degradato di tipo flocculare, accumulato a seguito della deficiente attività dell'alfa-mannosidasi lisosomiale.

Conclusioni

Come più volte accennato nel corso di questa relazione, le nuove tecniche istochimiche, immuno-istochimiche ed ultrastrutturali, hanno contribuito ad una più profonda comprensione morfo-funzionale dei processi morbosi che ha inoltre avuto importanti ripercussioni sulla metodologia diagnostica. Egualmente anche la funzione del patologo, che si avvale primariamente dell'**osservazione diretta** delle lesioni attraverso diverse tecnologie, è stata proiettata in avanti in una dimensione per certi aspetti diversa dal passato anche recente. Infatti, la possibilità di effettuare sui tessuti vere e proprie reazioni chimiche, fino a qualche tempo fa di sola competenza del biochimico, ha permesso di avere direttamente disponibili numerose informazioni circa le alterazioni, altrimenti non apprezzabili, che avvengono a carico di diverse strutture chimiche nel corso dei processi patologici.

A questo riguardo i nuovi sviluppi della ricerca ottenuti attraverso le tecniche di **ibridizzazione *in situ*** e **lo studio dei prodotti degli oncogèni,** sembrano essere il futuro prossimo della patologia e potranno sicuramente portare nuovi progressi nelle tecniche diagnostiche.

Infine, non possiamo non osservare come i risultati ottenuti mediante la **ricerca di base,** abbiano sempre, prima o dopo, delle ricadute di tipo tecnologico che si ripercuotono in applicazioni diagnostiche. Occorrerà quindi non dimenticare che l'avanzamento delle tecniche diagnostiche va di pari passo con lo sviluppo della ricerca di base.

Reagentario per l'applicazione delle principali tecniche descritte

A) Istochimica delle lectine

1. Lectine coniugate con fluoresceina, oppure
2. Lectine coniugate con perossidasi, oppure
3. Lectine coniugate con biotina + sistema ABC (Vector)
4. Diaminobenzidina

B) Immunoistochimica

Per la diagnostica oncologica dei tumori poco differenziati:

1. Anticorpi monoclonali anti:
   - citocheratine
   - vimetina
   - desmina
   - neurofilamenti
   - GFA
2. Anticorpi anti-Ig di topo coniugati con perossidasi o biotina (in quest'ultimo caso più il sistema ABC).
3. Diaminobenzidina

I prodotti sopra elencati sono facilmente reperibili presso le ditte specializzate nel settore chimico-biologico.

BIBLIOGRAFIA

1) ARIA G., VALENZA F. (1989): Sistema Endocrino.In: Guarda F., Mandelli G.: Trattato di Anatomia Patologica Veterinaria. UTET (Eds), Torino, 583-598.
2) MORA A., ANDREUCCI A. (1968): Sul riconoscimento al macello dei vitelli trattati con estrogeni. Atti SISVet, *22*, 570.
3) GUARDA F., BIOLATTI B., VALENZA F., MIGLIETTI M. (1988): Correlazioni anatomo-patologiche tra le lesioni del timo e dell'apparato genitale femminile di vitelli a carne bianca regolarmente macellati. Atti Soc. It. Buiatria, *XX*, 473-480.
4) HEWICKER M., TRAUTWEIN G. (1986): Glomerular lesions in MRL mice. A light and immunofluorescence microscopic study. J. Vet. Med. B, *33*, 727-739.
5) CARAMELLI M., BIANCO S., ARNAUD S., CANESE M.G., BARALIS G. (1987): Studio comparativo citologico e istologico del tumore mammario del cane. Atti SISVet, *XLI* (II), 867-870.
6) ARNAUD S., CANESE M.G., BIANCO S. (1988): Correlation between the histologic grading of dog mammary neoplasia biopsies and some parameters of the related cytologic smears. 9th Meeting of E.S.V.P., San Remo.
7) MAZZI V. (1977): Manuale di tecniche istologiche e istochimiche. Piccin Ed., Padova.
8) GUASCO R., CANESE M.G., VALENTE G., BIANCO S., GUARDA F. (1987): Histochemical study on normal calf thymus and during treatment with dexamethasone. 36° Tagung der Europaischen Gesellschaft fur Veterinarpathologie, Salisburgo.
9) ALROY J.N UCCI A.A., PEREIRA M.E.A. (1984): Lectins: histochemical probes for specific carbohydrate residues. In: R.A. DE LELLIS (Ed): Diagnostic Immunohistochemistry. New York, Masson Inc., vol. II, 66-88.
10) FEIZI T. (1985): Demonstration by monoclonal antibodies that carbohydrate structures of glycoproteins and glycolipids are onco-developmental antigens. Nature, *314*, 53.
11) DAMJANOV I. (1987): Lectin histochemistry and cytochemistry. Lab. Invest, *57*, 5-20.
12) CASTAGNARO M., NEGRO M., VALENZA F.: Glycoconjugate expression in normal hepatoid circumanal glands and during benign and malignant transformation in dogs. In

corso di stampa.
13) CASTAGNARO M., CANESE M.G. (1988): Lectin histochemistry as probe for different carbohydrates expression in normal, hyperplastic and malignant canine mammary gland tissue. 9th Meeting of E.S.V.P., San Remo.
14) CASTAGNARO M.: Le malattie da accumulo lisosomiale negli animali da reddito. Obiettivi e Documenti Vet., In corso di stampa.
15) ALROY J., UCCI A.A., PEREIRA M.E.A. (1984): Identification of glycoprotein storage diseases by lectins. A new diagnostic method. J. Histochem. Cytochem., *32*, 1280-1284.
16) CASTAGNARO M., ALROY J., UCCI A.A., JAFFE R. (1987): Lectin histochemistry and ultrastructure of kidneys from patients with I-cell disease. Arch. Path. Lab. Med., *111*, 285-290.
17) CASTAGNARO M., ALROY J., UCCI A.A., GLEW R.H. (1987): Lectin histochemistry and ultrastructure of feline kidneys from six different storage diseases. Virch. Arch. B, *54*, 16-26.
18) KOEHLER G., MILSTEIN C. (1975): Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature, *256*, 495.
19) BOLLO E. (1986): Anticorpi monoclonali. Produzione e applicazioni in campo veterinario. Summa, *3*, 269-272.
20) WEBER K., OSBORN M. (1982): Cytoskeleton: definition, structure and gene regulation. Path. Res. Pract., *175*, 128-145.
21) CANESE M.G., CARAMELLI M., BIANCO S.: (1989): Complex tumours of dog mammary glands. An ultrastructural and immunohystochemical study. 38° Tagung der Europaischen Gesellschaft fur Veterinarpathologie, Coblenza.
22) CARAMELLI M., DELL'ERNO E., BIANCO S., CANESE M.G. (1988): Indagine sulla possibilità di impiego di un sistema immunocitochimico per la rivelazione dei recettori estrogenici nel tumore mammario del cane. Atti SISVet, *XLII*. In corso di stampa.
23) BOLLO E., ZURBRIGGEN A., VANDEVELDE M., FANKHAUSER R. (1986): Canine distemper virus clearence in chronic inflammatory demyelination. Acta Neuropathol., *72*, 69-73.
24) BOLLO E., VALENZA F., CORNAGLIA E. (1988): Evidenziazione delle proteine strutturali del virus del cimurro mediante anticorpi monoclonali nelle lesioni del sistema nervoso centrale del cane. Boll. AIVPA, *XXVII*, 5-9.
25) CORNAGLIA E., SCHINDLER P., TASSI P., WIDENHORN O. (1979): Macrogametogenesi di *Eimeria acervulina:* osservazioni ultrastrutturali. La Clin. Vet., *102*, 330-335.
26) MISCIATELLI M.E., GUARDA F., VALENZA F., BELLETTI G.L., SALI G., RIGHI F., PEVERI F., BIANCARDI G. (1979): Parvovirus associati a gastroenterite nei cani: identificazione al microscopio elettronico con applicazioni di immuno-elettronmicroscopia, rilievi istopatologici, ematologici e clinici. Prima segnalazione in Italia. Annali Fac. Med. Vet. Torino, *26*, 23-30.
27) MISCIATELLI M.E., BELLETTI G.L., GUARDA F., MANSTRETTA G., BIANCARDI G. (1980): Rota- e coronavirus associati a diarrea neonatale dei vitelli: identificazione al microscopio elettronico con applicazione di immuno-elettronmicroscopia, rilievi istopatologici e clinici. Schweiz. Arch. Tierheilk., *122*, 403-413.
28) MISCIATELLI M.E., GUARDA F., VALENZA F., BIANCARDI G., BELLETTI G.L., VISAI I., BEZZECCHI G. (1980): Epatite infettiva del cane: diagnosi eziologica retrospettiva al microscopio elettronico. Annali Fac. Med. Vet. Torino, *27*, 3-16.
29) MISCIATELLI M.E., BIANCARDI G., BELLETTI G.L., GUARDA F. (1981): Problemi diagnostici delle malattie neonatali: contributo della microscopia elettronica. Atti SISVet, *35*, 109-124.
30) FINAZZI M., SIRONI G., SCANZIANI E., LUINI M. (1987): Enterite da adenovirus nel bovino. Atti SISVet, *41*, 823-824.
31) GUASCO R., ARIANO F., GUGLIELMINO R., CANESE M.G.: Indagine ultrastrutturale del sangue periferico bovino in corso di leucosi bovina enzootica. Atti SISVet, *XLII*, In corso di stampa.
32) WRIGHT N.G., NASH A.S., THOMPSON H., FISHER E.W. (1981): Membranous nephropathy in the cat and dog. A renal biopsy and follow-up study of sixteen cases. Lab. Invest., *45*, 269-277.

Gualtieri M., Addis F., Mortellaro C.A., Fonda D., Romussi S.
Istituto di Clinica Chirurgica Veterinaria - Facoltà di Medicina Veterinaria
Università degli Studi di Milano

Importanza della fibroscopia nella diagnosi delle neoplasie dell'apparato gastroenterico del cane

Premessa

Il primo approccio all'indagine endoscopica risale al secolo scorso e mirava essenzialmente all'ispezione delle prime porzioni degli apparati esplorabili.

Essa veniva messa in atto utilizzando strumenti rigidi e di conseguenza particolarmente traumatizzanti per il paziente e con un elevato margine di rischio nell'esecuzione.

Con l'avvento delle fibre ottiche flessibili si è avuta poi un'autentica rivoluzione in questo settore della medicina esistendo così la possibilità di esplorare gran parte degli apparati digerente, respiratorio, genito-urinario in modo completamente atraumatico e con margine di rischio per il paziente pressoché nullo.

Quegli apparati che, fino a pochi anni orsono, erano studiati essenzialmente mediante la radiologia, oggi possono essere esplorati in ogni loro minima porzione dall'endoscopista che può mettere in evidenza patologie che con altri presidi semeiologici non sarebbe neppure possibile ipotizzare.

Tutto ciò è inoltre reso reale grazie anche alla utilizzazione di quelle tecniche diagnostiche accessorie all'endoscopia quali la citologia, la biopsia tissutale e la colorazione vitale della mucosa e che rendono ancor più straordinaria questa metodica.

Introduzione

Prima di addentrarci più dettagliatamente in ciò che sarà l'argomento di questa trattazione, non ci sembra fuori luogo ricordare alcune regole generali fondamentali per eseguire un corretto esame fibroscopico, quali: conoscenza delle nozioni tecnologiche sulla strumentazione, dell'anatomia topografica e delle patologie degli organi da esaminare, delle tecniche di introduzione dello strumento e di prelievo bioptico, delle manualità terapeutiche principali.

Anche se può sembrare superfluo, è bene ricordare che un endoscopio flessibile è costituito essenzialmente da due differenti tipi di fasci di fibre ottiche: un primo tipo costituito da fibre dette "coerenti" le quali, disposte nello stesso ordine all'inizio e alla fine del fascio, consentono la visione; da un secondo tipo di fibre dette "non coerenti" che servono esclusivamente a veicolare la luce da una sorgente luminosa alla cavità da esaminare. Questi fasci di fibre sono contenuti in una struttura rigida, ma molto flessibile, costituita da una serie di anelli metallici articolati tra loro e rivestiti da una guaina di materiale plastico.

Sempre all'interno di questa struttura decorre, da un capo all'altro dello strumento, un piccolo canale, detto "operativo", attraverso cui è possibile aspirare, insufflare, introdurre pinze o altri strumenti per eseguire biopsie, piccoli interventi, per afferrare corpi estranei, ecc.

L'estremità distale dello strumento può essere liberamente direzionata dall'operatore agendo sugli appositi comandi posti nella porzione prossimale in cui sono collocati, oltre all'oculare per la visione, altri comandi per le funzioni già descritte.

Nell'ambito delle infinite possibilità applicative della fibroscopia nella clinica del cane, prenderemo ora in considerazione la patologia di tipo neoplastico dell'apparato gastroenterico del cane, argomento di grande interesse e per noi oggetto di studio da numerosi anni, sottolineando l'importanza dell'endoscopia nella loro diagnosi.

Tralasciando quelli che sono gli aspetti terapeutici di queste forme, non essendo essi pertinenti alle indicazioni richieste in questa sede, rimandiamo perciò ad altri nostri lavori sull'argomento (1,3,5,9).

Apparato gastroenterico anteriore

Le neoplasie dell'apparato gastroenterico anteriore (esofago, stomaco, duodeno) possono essere considerate poco frequenti nel cane (3,15,16,18,19).

L'**esofago** è l'organo che risulta meno colpito da queste forme patologiche sia per quanto concerne le forme benigne, sia ancor più, per quelle maligne.

Nella nostra esperienza è stato possibile osservare, tra le forme benigne, una poliposi del terzo prossimale dell'esofago e un leiomioma situato a livello cardiale.

Queste forme possono essere assolutamente asintomatiche come nel caso della poliposi (figura 1) e risultare quindi reperto occasionale in corso di esame, oppure possono determinare disturbi digestivi secondari all'azione ostruttiva e/o stenosante da esse esercitata a livello luminale o sfinteriale (figura 2) ed in rapporto alla dimensione raggiunta dalla neoplasia.

In questi casi l'indagine radiografica, sia diretta sia contrastografica, consente la valutazione delle dimensioni e degli eventuali rapporti della neoplasia con gli organi circostanti, ma difficile risulta la valutazione del grado di coinvolgimento della mucosa che, anche in condizioni di normalità, è in quest'organo difficilmente indagabile (4).

L'esame endoscopico si rivela così fondamentale poiché non solo consente una precisa valutazione del grado di alterazione della mucosa, ma mediante l'impiego di una biopsia mirata consente di tipizzare la lesione stessa e di emettere quindi una diagnosi di certezza.

È tuttavia soprattutto in rapporto alle neoplasie dello **stomaco** che l'esame endoscopico costituisce, secondo la nostra esperienza, il presidio diagnostico di elezione (3).

Anche per lo stomaco valgono gli stesso concetti espressi precedentemente per l'esofago, pertanto trascureremo le forme benigne (8) e prenderemo in considerazione le forme maligne nelle quali la tempestività nella diagnosi può costituire elemento prognostico favorevole.

Figura 1 - **Poliposi del terzo prossimale dell'esofago.**

Figura 2 - **Leiomioma stenosante cardiale.**

Va ancora ricordato che, nonostante nel cane il tumore maligno dello stomaco sia considerato evenienza rara (13,15,16,19), negli ultimi anni si è assistito, nella nostra esperienza (3), ad un incremento dell'incidenza di tale forma neoplastica. Non siamo ancora in grado comunque di affermare se questo aumento sia epidemiologicamente significativo oppure sia la conseguenza dell'evoluzione e dell'affinamento delle tecniche diagnostiche e quanto in ciò abbia avuto un ruolo significativo l'impiego routinario della fibroscopia.

L'ambiguità dei sintomi clinici in corso di neoplasia gastrica nel cane fa sì che la diagnosi di questa patologia risulti difficoltosa secondo le normali procedure.

L'insorgenza improvvisa, infatti, della sintomatologia caratterizzata essenzialmente da vomito, anoressia, dimagramento e l'assenza di alterazioni dei normali parametri ematologici ed ematochimici, può rendere oltremodo difficoltosa la diagnosi differenziale con altre e più comuni patologie dell'apparato digerente (6).

È solo l'indagine radiologica che può essere suggestiva di neoplasia gastrica, in quanto è in grado di fornire sia dati relativi alle variazioni dei normali tempi di riempimento e/o di svuotamento dello stomaco (contrastografia) sia sullo stato della mucosa, della parete e del lume del viscere. Tuttavia solamente in pochi casi la valutazione radiologica ha permesso di emettere diagnosi certa di neoplasia gastrica specialmente in quei casi in cui all'infiltrazione mucosale non fa seguito un caratteristico coinvolgimento della parete (3,4,17,18).

È a questo punto dell'*iter* diagnostico che l'esame endoscopico può risultare decisivo consentendo innanzitutto la visualizzazione diretta dell'area patologica e permettendo di definire in modo preciso la localizzazione, il grado di coinvolgimento mucosale, l'estensione della lesione e l'eventuale interessamento degli strati sub-mucosali o della parete. L'elemento fondamentale su cui basare la diagnosi è comunque affidato, oltre che all'occhio esperto dell'endoscopista, soprattutto alla possibilità di prelevare in modo mirato materiale cellulare per un esame citologico (*brushing*), o ancora per un esame istopatologico del tes-

suto sospetto (biopsia tissutale).

Nella nostra esperienza a fronte della variabilità morfologica delle forme osservate, al fine di garantire una omogeneità terminologica e quindi un dialogo sia nello studio dell'oncologia comparata, sia nel confronto diretto tra endoscopisti veterinari, ci è sembrato importante raggruppare le anormalità endoscopiche in tre grandi categorie in accordo alla classificazione usata in endoscopia digestiva umana (14).

Cancro exofitico ulcerativo. È questa la forma che più frequentemente si è presentata alla nostra osservazione: in questi casi generalmente ampissime porzioni dell'organo sono colpite dal processo neoplastico e sono caratterizzate dal precipuo coinvolgimento della mucosa che si presenta cosparsa di aree necrotiche, ulcerazioni ed erosioni più o meno ampie e profonde (figure 3-4). Al contatto con la pinza bioptica si constata friabilità della mucosa con facile ed abbondante sanguinamento (figura 5). La parete gastrica alla "palpazione" con pinza bioptica risulta aumentata di consistenza e quest'aumento può essere presente anche in quelle porzioni di organo circostanti la lesione e che non sono coinvolte dall'interessamento mucosale. Difficoltosa risulta anche l'insufflazione dell'organo, indice questo di una marcata anelasticità della parete.

Cancro infiltrativo. In questi casi solitamente è la modificazione del lume e/o della forma dell'organo la prima alterazione che si evidenzia all'esplorazione endoscopica. La mucosa perde il normale aspetto traslucido e appare opaca con colorito più chiaro del normale. La plicatura gastrica risulta ridottissima o assente e la consistenza dell'organo, al contatto con la pinza bioptica, risulta lignea (figure 6-7). Nella maggior parte di queste forme, far compiere movimenti di avanzamento o di retroversione allo strumento, all'interno del viscere, risulta estremamente difficoltoso.

Cancro ulcerativo. Si presenta come una lesione ulcerata, di dimensioni variabili, rilevata sulla mucosa circostante, a bordi edematosi e generalmente irregolari (figura 8). Il fondo dell'ulcera può presentarsi ombelicato o provvisto di piccole rilevatezze nodulari (figura 9).

Nella porzione d'organo circostante l'ulcera, è sempre stato possibile rilevare sia l'interessamento della mucosa che si presentava di colorito chiaro e di aspetto opaco, sia soprattutto un aumento di consistenza della parete di detta porzione. Le forme localizzate al canale pilorico determinano generalmente un restringimento anulare che può addirittura impedire l'avanzamento dell'endoscopio.

È chiaro tuttavia che non esiste una demarcazione netta tra le singole forme ricordate, ma più spesso sono presenti stadi intermedi che variano in funzione della precocità con cui viene effettuata la diagnosi, anche se non sembra esistere correlazione tra grado di sviluppo della neoplasia e comparsa del quadro sintomatologico.

Per contro esistono forme in cui, alla gravità della sintomatologia, non si accompagnano altrettanto gravi lesioni macroscopiche e ciò potrebbe indurre l'endoscopista ad una diagnosi "approssimativa".

Da qui è nata l'esigenza di poter disporre di una metodica conservativa che, sempre in ambito endoscopico, consente di evidenziare macroscopicamente lesioni altrimenti non valutabili.

Figura 3 - **Cancro exofitico ulcerativo: la mucosa appare cosparsa di aree necrotiche, erosioni, ulcerazioni.**

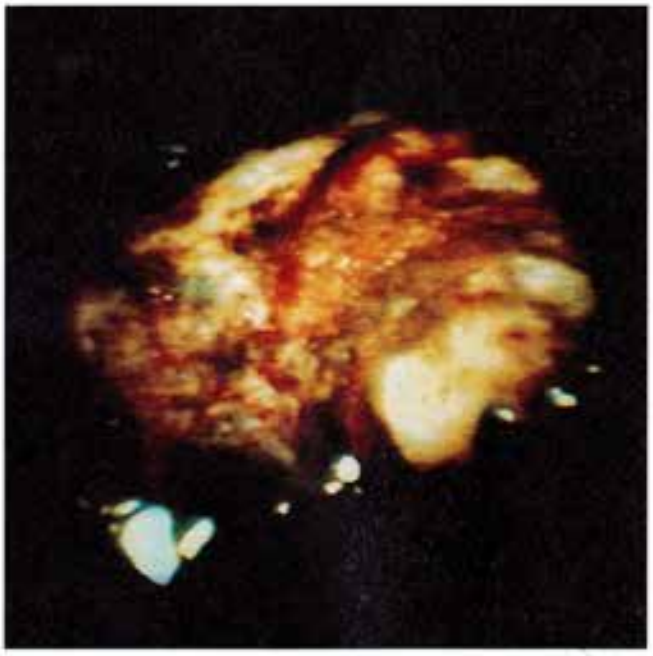


Figura 4 - **Cancro exofitico ulcerativo: particolare della figura precedente.**

Figura 5 - **Cancro exofitico ulcerativo: emorragie spontanee della mucosa.**

Figura 6 - **Cancro infiltrativo: la plicatura della mucosa gastrica risulta assente.**

Figura 7 - **Cancro infiltrativo: carcinoma della piccola curvatura con emorragia post-bioptica.**

Figura 8 - **Cancro ulcerativo: ulcerazione con evidente interessamento della mucosa circostante.**

Figura 9 - **Cancro ulcerativo: il fondo dell'ulcera presenta piccole rilevatezze nodulari.**

La colorazione vitale dei tessuti si presta ottimamente a questo scopo consentendo, grazie alle capacità elettive dei coloranti impiegati di reagire con il tessuto neoplastico, una conferma diagnostica e soprattutto una esatta delimitazione della lesione (7).

Da quanto detto appare evidente l'estrema versatilità dell'endoscopia nella diagnosi delle neoplasie gastriche, tuttavia, qualora si vogliano ottenere ulteriori informazioni ai fini prognostici, è possibile ricorrere ad indagini collaterali complementari all'endoscopia stessa quale l'ecografia gastrica eseguita simultaneamente all'endoscopia (2).

Sempre nell'ambito del settore gastrico anteriore consideriamo ora il **duodeno**, anch'esso sede non frequente di lesioni neoplastiche sia benigne sia maligne (15,16,19). Nella nostra personale esperienza non abbiamo mai osservato neoformazioni benigne e ciò per la relativa asintomaticità di queste forme e sempre comunque in relazione alle loro dimensioni. Data la difficoltà che spesso si incontra nel raggiungere questo segmento intestinale, imposta essenzialmente dalle dimensioni e dallo stato del piloro, ne risulta improbabile il reperimento occasionale (lipomi, leiomiomi, adenomi).

Tra le forme maligne abbiamo invece osservato un caso di adenocarcinoma coinvolgente il piloro, la prima porzione duodenale e il dotto coledoco ed un adenocarcinoma ulcerato localizzato nel terzo medio del duodeno ascendente (figura 10).

Anche in questi casi già radiograficamente è possibile emettere un sospetto di neoplasia, anche se il carattere macroscopico di malignità di queste lesioni può essere confermato unicamente con l'esame fibroscopico.

Apparato digerente posteriore

Considerando l'apparato digerente posteriore (retto, colon, cieco, porzione terminale dell'ileo) possiamo affermare che, in analogia a quanto si è verificato per la cavità gastrica, l'impiego routinario dell'endoscopia ha fatto sì che la diagnostica delle malattie del colon e del retto si sia arricchita di nuove tecniche di indagine e non sia più di pertinenza strettamente radiologica e chirurgica.

Nella nostra esperienza, l'incidenza delle forme benigne (polipi adenomatosi, adenomi papillari) a livello di **colon** e di **retto** è abbastanza rilevante, anche se la maggior parte di esse è stata osservata come reperto occasionale in corso di esame per altra patologia(12).

Tuttavia con il termine di "polipo" vengono compresi sia i tumori di natura infiammatoria sia i tumori epiteliali dei quali è noto il potenziale maligno, quindi l'endoscopista non deve esimersi, in questi casi, dal compiere sempre biopsie multiple e soprattutto dall'asportare *in toto* la neoformazione. Queste forme che possono essere peduncolate o sessili e di dimensioni variabili (3-10 mm), si presentano rivestite di mucosa integra e generalmente iperemica (figura 11). La base di impianto può essere più o meno ampia e la localizzazione più frequente risulta essere quella rettale seguita da quella colica.

Le forme maligne rivestono indubbiamente maggiore interesse sia in rapporto alla loro frequenza e gravità, sia in rapporto alla difficoltà nella loro diagnosi (12).

Figura 10 - **Duodeno: adenocarcinoma ulcerato**

Figura 11 - **Retto: poliposi**

Figura 12 - **Retto: adenocarcinoma a carattere stenosante.**

Figura 13 - **Retto: adenocarcinoma mucinoso a carattere infiltrativo.**

Il tipo istologico più frequente in questi casi è costituito dall'adenocarcinoma la cui sede di insorgenza, pur essendo ubiquitaria, è con netta prevalenza nel retto. Tenesmo, dischesia, proctorragia costituiscono il quadro sintomatologico, assolutamente non patognomonico, relativo a quest'ultima localizzazione.

All'esplorazione rettale non sempre è percepibile una modificazione della parete dell'organo e ciò è in rapporto sia alla possibile localizzazione craniale della neoplasia, sia alle sue caratteristiche morfologiche.

L'esame radiografico può costituire un valido supporto diagnostico soprattutto se eseguito con doppio mezzo di contrasto anche se, come le altre neoplasie dell'apparato gastroenterico, lascia sempre adito a dubbio diagnostico.

L'osservazione endoscopica invece lascia di solito pochi dubbi sulla natura della lesione che può avere un aspetto ulcerato, infiltrante, vegetante, analogamente a quanto accade per i tumori gastrici (figure 12-13).

L'esecuzione della biopsia tissutale consente nella quasi totalità dei casi la ti-

pizzazione istologica. A questo riguardo non è inutile ricordare che spesso, come per tutte le neoplasie degli altri apparati, a causa dell'esiguità del materiale bioptico prelevato e ancor più per il mancato coinvolgimento della mucosa nel processo patologico, tale metodica può fornire dei falsi negativi.

A livello del colon non è stata da noi mai osservata nessuna forma neoplastica maligna fatta eccezione per una forma di carcinoma che coinvolgeva l'intera struttura ileo-cieco-colica.

Conclusioni

Alla luce di quanto esposto riteniamo di poter affermare che l'indagine fibroscopica costituisce l'esame di elezione per la diagnosi delle neoplasie dell'apparato gastroenterico. È fondamentale comunque non dimenticare che le possibilità applicative di questa metodica non si esauriscono in tale ambito, ma possono essere estese tanto alle patologie di tipo non neoplastico quanto agli altri apparati esplorabili (respiratorio, urogenitale).

L'importanza di una diagnosi mirata, precisa e rapida, costituisce un ausilio fondamentale alla terapia ed in alcuni casi elemento discriminante immediato per un giudizio prognostico *quoad vitam*.

Quanto detto presuppone che alla base della formazione dell'endoscopista vi sia una approfondita conoscenza non solo delle patologie investigabili endoscopicamente, ma anche della radiologia e soprattutto della clinica. Ciò affinché l'impiego di questa metodica sia inserito in un *iter* diagnostico ben preciso e non rappresenti "l'ultima spiaggia" nella complessa risoluzione di un caso clinico.

BIBLIOGRAFIA

1) Cheli R., Addis F., Mortellaro C.M., Fonda D., Gualtieri M., Spinelli P. (1985): La fibroscopia nella clinica canina. Obiettivi e Documenti Veterinari, *VI*, 23-29.
2) Ferro E., Gualtieri M., Brambilla P.G., Romussi S. (1988): L'ecografia gastrica quale supporto all'endoscopia nella diagnosi delle neoplasie dello stomaco del cane. Atti SISVet., *XLII*, Mantova (in corso di stampa).
3) Fonda D., Gualtieri M., Scanziani E. (1988): Gastric carcinoma in the dog: a clinicopathologic study of 11 cases. Journal of Small Animal Practice. (in corso di stampa).
4) Gomez J.A. (1974): The gastrointestinal contrast study, methods and interpretation. Veterinary Clinics of North America, *4*, 805-807.
5) Gualtieri M., Mortellaro C.M. (1985): La fibroscopia nell'indagine rinoscopica del cane. Atti SISVet, *39*, 228-230.
6) Gualtieri M., Fonda D. (1988): Gastropatia cronica con ipertrofia antro-pilorica nel cane: diagnosi e terapia. Atti SISVet, *XLII*, Mantova (in corso di stampa).
7) Gualtieri M., Addis F. (1988): Gastroesophageal chromoendoscopy in the dog. Atti E.S.V.S., *81*, 91.
8) Happe R.P., Gaag I. Van Der, et al.(1977): Multiple polyps of gastric mucosa in two dogs. J. Sm. An. Pract., *18*, 179.
9) Happe R.R., Gaag. Van Der (1983): Endoscopic examination of esophagus, stomach and duodenum in the dog. J.A.A.H.A., *19*, 197.
10) Johnson G.F., Twedt D.C. (1977): Endoscopy and laparoscopy in the diagnosis and

management of neoplasia in small animals. Vet. Clin. of North Am., *7*, 77.
11) JOHNSON G.F. (1980): Endoscopic examination. Part IV. Gastroscopy.In: Anderson N.V.(Ed.) Veterinary Gastroenterology. Lea & Febiger, Philadelphia.
12) JOHNSON G.F.(1980): Endoscopic examination. Part VIII Colonscopy - Part IX Proctoscopy. In: Anderson N.V. Veterinary Gastroenterology, Lea & Febiger, Philadelphia..
13) LINGEMAN C.H., GARNER F.M., TAYLOR D.O.N. (1971): Spontaneous gastric adenocarcinomas of dogs: a review. J. of National Cancer Institute, *47*, 137-153.
14) MARATKA Z. (1984): Terminology, definitions and diagnostic criteria in digestive endoscopy. Scandinavian J. of Gastroenterology, *19*, 1-54.
15) MOULTON J.E. (1985): Tumour of the alimentary tract. In: Moulton J.E. (Ed.):Tumours in domestic animals., University of California Press, Berkeley: 259-262.
16) PATNAIK A.K., HURVITZ I., JOHNSON G.F. (1977): Canine gastrointestinal neoplasms. Veterinary Pathology, *14*, 547-555.
17) SAUTTER J.H., HANLON G.F. (1975): Gastric neoplasia in the dog: a report of 20 cases. J. Am. Vet. Med. Ass., *166*, 691-696.
18) SULLIVAN M., LEE R., FISHER E.W., NASH A.S., MC CANDLISH I.A.P. (1987): A study of 31 cases of gastric carcinoma in dogs. Vet. Rec., *120*, 79-83.
19) THEILEN G.H., MADEWELL B.R. (1987): Tumours of the digestive tract. In:Theilen G.H., Madewell B.R. (Eds):Veterinary Cancer Medicine. Lea & Febiger, Philadelphia: 317.
20) TWEDT D.C., WINGFIELD W.E. (1983): Diseases of the stomach. In: Ettinger S. J.(Ed.):Textbook of Veterinary Internal Medicine. Saunders, Philadelphia:1267-1269.
21) WINGFIELD W.E., TWEDT D.C. (1986): Medical diseases of the stomach.In:Jones B.D., Liska W.D.(Eds): Canine and Feline Gastroenterology. Saunders, Philadelphia:124-126.
22) ZIMMER J.F. (1980): Gastrointestinal fiberoptic endoscopy. In: Kirk R.W.(Ed.): Current veterinary therapy. VII ed. Saunders, Philadelphia: 954-961.

Yves M. Galante
Scuola di specializzazione in chimica e tecnologia alimentare
Università di Parma

Metodi rapidi immunoenzimatici per il dosaggio di contaminanti chimici e biologici negli animali e prodotti da essi derivati

Una delle prime e più innovative applicazioni della biotecnologia moderna, nel settore agro-alimentare e nel monitoraggio ambientale, è rappresentata dal rapido sviluppo di nuovi metodi diagnostici.

Questi sistemi appartengono a tre categorie di test: **enzimatici, immunologici** e **a sonde nucleiche**.

I test enzimatici

I test enzimatici sono storicamente i primi metodi biochimici di analisi e sono oramai entrati a far parte della routine di molti laboratori di controllo alimentari.

Essi sono utilizzati per misurare la concentrazione di una determinata sostanza (es., un alcool, uno zucchero oppure una vitamina) oppure la presenza di un contaminante chimico (es., un pesticida) oppure anche il livello di certi prodotti di degradazione, la cui concentrazione in alcuni alimenti è considerata rappresentare un indice di freschezza del prodotto. Una reazione enzimatica è facilmente misurata, in referenza ad un valore di controllo, attraverso un segnale colorimetrico o fluorescente positivo oppure negativo (se la cinetica è inibita da un inibitore specifico). Un interessante esempio di inibizione enzimatica sfruttata in diagnostica alimentare ed ambientale è quello della determinazione di residui di insetticidi a base di organofosfati e di tiocarbamati (ad esempio, il malathion o il parathion) presenti su ortaggi, frutta e vegetali in genere. Questo *kit* per insetticidi è semplicissimo nella sua concezione e manualità e può perfino essere immaginato come uno strumento d'analisi di cui anche lo stesso Ispettore Sanitario (e non solo il laboratorio attrezzato della struttura pubblica o dell'industria alimentare) si potrebbe servire per monitorare la presenza di tracce di contaminanti chimici negli alimenti. Il test misura l'inibizione da parte di tracce di insetticida (da 0,005 a 5 ppm) dell'enzima acetilcolina-esterasi purificato da un ceppo selezionato di mosche oppure dalla testa di api. L'acetilcolina-esterasi è un enzima cruciale del sistema nervoso degli insetti ed è il *target in vivo* di questa classe di pesticidi. Inoltre, l'enzima estratto da insetti è molto più sensibile all'inibizione da parte di tiocarbamati e di organofosfati piuttosto che quello da cervello di mammifero, permettendo quindi lo sviluppo di un test considerevolmente più sensibile. La reazione enzimatica causa la formazione di 5-thio-2-nitrobenzoato, un composto giallo intenso, a partire da acetiltiocolina e da acido 5,5-di-thio-bis-2-nitrobenzoico (il comune reagente di Ellman per la determinazione dei gruppi tiolici). L'intensità del colore può essere giudicata

ad occhio nudo quando una determinazione è fatta in campo o lungo la catena di distribuzione alimentare, oppure con un comune colorimetro portatile.

Un altro test enzimatico molto originale è stato messo a punto da un gruppo di ricercatori giapponesi per la valutazione rapida oggettiva della freschezza del pesce, ma potenzialmente anche di altri prodotti alimentari deperibili di origine animale come la carne di pollo. Il test determina in un campione di muscolo di pesce, omogeneizzato ma non deproteinizzato, il livello di inosina ed ipoxantina provenienti dalla degradazione dell'ATP per autolisi, prima che si inneschi il processo di putrefazione. Il formato del test è quello di un'astina su cui sono immobilizzati gli enzimi nucleoside-fosforilasi e xantina-ossidasi per catalizzare in maniera sequenziale la formazione di xantina da inosina e ipoxantina, con formazione finale di acido urico grazie alla riduzione di un composto incolore in un prodotto colorato. Confrontando il colore sviluppato sull'asticella con una scala di referenza opportuna, si ottiene il valore di un parametro "K" equivalente al rapporto della somma di inosina più ipoxantina sulla quantità totale di ATP più sostanze derivate da ATP. Questo valore di K dovrebbe quindi essere in relazione inversa alla freschezza del pesce (più basso è il valore di K più fresco è il pesce, e viceversa). Se tale *kit* diagnostico enzimatico "di freschezza" fosse validato e messo a disposizione di laboratori di controllo, mercati generali e catena di distribuzione dei prodotti ittici, industrie di trasformazione del pesce ed ispettori annonari, potrebbe aiutare in modo significativo nella prevenzione delle intossicazioni da pesce e nella frode commerciale di pesce congelato venduto per fresco.

Per il dosaggio di singoli composti negli alimenti, numerosi test enzimatici sono diventati parte integrante della routine analitica (anche quella automatizzata da una moderna robotica) di varie industrie alimentari: delle bevande, dei succhi di frutta, delle conserve e della lavorazione della carne. In genere, questi test misurano l'aumento o la diminuzione di concentrazione di NAD(P)H provocata da una reazione enzimatica di ossido-riduzione singola oppure accoppiata. La lista dei test diagnostici enzimatici concepiti su questo formato è oramai lunga e molti di essi sono commercialmente disponibili anche in Italia. Ad esempio, i seguenti composti chimici possono essere misurati semplicemente con una reazione enzimatica: l'acido acetico *via* la acetil-CoA-sintetasi, la citrato sintetasi e la malato-deidrogenasi; l'acido ascorbico *via* l'ascorbato-ossidasi; l'acido citrico *via* la citrato-liasi, la malato-deidrogenasi e la lattato-deidrogenasi; l'acido glutammico *via* la glutammato deidrogenasi; l'acido lattico *via* la lattato-deidrogenasi in presenza di glutammato-piruvato transaminasi; l'amido *via* l'amiloglucosidasi, per generare monomeri di glucosio che sono in seguito fosforilati a glucosio-6-fosfato ed infine ossidati dalla glucosio-6-fosfato-deidrogenasi; il colesterolo *via* la colesterolo ossidasi e la catalasi; i nitrati *via* la nitrato-reduttasi; ecc.

Ovviamente, tutti questi saggi enzimatici possono, dati i corretti rapporti di enzimi specifici e di substrati intermedi nella miscela di reazione, eseguire anche analisi del rapporto di sostanze, come ad esempio: urea/ammoniaca, saccarosio/glucosio/fruttosio, lattosio/glucosio, e così via. Sono rapporti di concentrazione spesso importanti da conoscere per la valutazione del grado di maturazione di materie prime da trasformare oppure a vari stadi di un processo in-

dustriale. Infine, va menzionato che alcuni di questi test sono disponibili anche nel formato di biosensori: gli enzimi sono cioè integrati in un sistema capace di trasduzione del segnale, ad un apparecchio per misurazioni *on-line*. Esempi di biosensori già commercialmente disponibili in applicazioni industriali sono, oltre quello ben noto per il glucosio, quelli per : acido glutammico, urea, acido malico, ecc.. Lo sviluppo dei biosensori è ancora in una certa misura ritardato da problemi di stabilità, delle molecole biologiche immobilizzate su membrane, e di miniaturizzazione, ma indubbiamente la loro prossima introduzione nell'industria alimentare permetterà di raggiungere un livello sostanzialmente migliore di controllo di qualità e di monitoraggio di processo.

I test immunoenzimatici

I test immunologici tradizionali fanno da tempo parte dell'armamentario diagnostico del laboratorio veterinario, come per la determinazione radioimmunologica di ormoni e di agenti infettivi. Tuttavia, sono stati compiuti notevolissimi progressi negli ultimi anni nello sviluppo di saggi immunoenzimatici con tali caratteristiche di sensibilità, specificità, rapidità d'esecuzione e di risposta, facilità d'uso e d'interpretazione, da permettere una larghissima diffusione della diagnostica e della prevenzione di patologie e tossinfezioni alimentari (es., test rapidi per individuare la presenza di progesterone nel latte, per la diagnosi di microfilariosi dei cani, di leucemia felina, leucosi bovina, anemia infettiva, fascicoliasi epatobiliare, virus dei polli, aflatossine ed enterotossine negli alimenti, ecc). Questi progressi sono soprattutto dovuti a: 1) la scoperta della tecnologia degli ibridomi per la produzione di anticorpi monoclonali; 2) la disponibilità di nuove e migliorate fasi solide per la messa a punto di saggi immunoenzimatici eterogenei; 3) la nuova chimica di coniugazione di proteine a proteine e di proteine a piccole molecole, che ha permesso la messa a punto di test immunoenzimatici facili, sensibili ed affidabili.

E' ora disponibile per il veterinario e per il laboratorio di controllo alimentare una nuova generazione di test per determinare in maniera semiquantitativa la presenza di pesticidi, antibiotici e micotossine in: acqua, urina, siero, tessuti animali o vegetali, latte, uova, ecc., alcuni da eseguirsi in circa 10 minuti, con nessuna o minima preparazione del campione da analizzare, senza necessità di strumentazione o di particolare addestramento del personale. Un *kit* di dosaggio è costituito da una piccola confezione completa di tutti i reagenti ed accessori. La provetta o la carta in cui si esegue la misura porta un anticorpo specifico ad essa immobilizzato ed i tre o quattro reagenti necessari sono aggiunti in maniera sequenziale fino alla rivelazione della reazione enzimatica, in modo da poter eseguire il test anche al di fuori del laboratorio specializzato. Grazie a questi nuovi metodi, diventa quindi possibile eseguire analisi accurate in stalla per controllare i tempi di interruzione di un antibiotico, oppure su un animale da carne prima o dopo macellazione, su altri prodotti alimentari di derivazione animale e più in generale lungo tutta la catena alimentare.

Per riassumere brevemente, i saggi immunologici sono procedure analitiche basate sullo specifico legame di immunoglobuline di derivazione animale (gli

anticorpi) a molecole bersaglio (gli antigeni). Se accoppiati ad un sistema di visualizzazione (come può essere una reazione colorimetrica in un saggio immunoenzimatico), questo tipo di dosaggio offre un metodo di determinazione e di quantificazione semplice, specifico e sensibile di una vasta gamma di antigeni (gli analiti), siano essi microorganismi, fagi, tossine biologiche, composti chimici come antiparassitari, antibiotici, ecc., nell'acqua o in matrici biologiche diversissime e complesse come si riscontra nell'industria agro-alimentare. I saggi immunologici dei prodotti agricoli, degli alimenti e dei mangimi sono un'estensione naturale di questa tecnologia dal campo della salute umana, in cui sono diventati di uso estremamente diffuso nella pratica clinica e perfino domestica (vedi i test di gravidanza e di ovulazione). Anche se non tutti i saggi immunologici utilizzano un enzima come sistema di determinazione, i saggi immunoenzimatici (**EIA** nella dizione inglese di *Enzyme Immuno-Assays*) rappresentano il tipo di test più comunemente disponibile per analisi agro-alimentare-ambientale.

In un tipico EIA, è l'anticorpo oppure l'antigene ad essere coniugato ad un enzima, a seconda di come il test sia configurato: ai fini dell'analisi il risultato non cambia.

Un saggio immunoenzimatico sfrutta due importanti fenomeni biologici: a) lo straordinario potere di discriminazione degli anticorpi per la loro molecola bersaglio, grazie all'abilità del sistema immunitario dei vertebrati di produrre anticorpi specifici per una gamma virtualmente illimitata di strutture molecolari; b) l'alta attività catalitica e la specificità degli enzimi. Un EIA è quindi basato su una doppia strategia: prima è provocata una reazione di legame non covalente fra antigene ed anticorpo, e in seguito viene sviluppata la reazione dell'enzima coniugato all'anticorpo o all'antigene fissatosi alla fase solida. Nei saggi eterogenei (in cui sono presenti due fasi, una liquida ed una solida) è sempre necessario una fase di lavaggio per separare i reagenti che si sono legati da quelli in eccesso, prima dell'aggiunta del substrato enzimatico. Tali EIA richiedono quindi l'uso di una fase solida appropriata (di polistirene, policarbonato, nylon, acetato di cellulosa, ecc.) per eseguire il lavaggio e la successiva misura, e sono definiti **EIA eterogenei** perché sono implicate appunto due fasi: una liquida (la soluzione di reazione) ed una solida (il supporto).

Innanzitutto, la disponibilità di anticorpi monoclonali con specificità ed affinità predeterminate, prodotti *in vitro* con tecnologie di colture cellulari, permette lo sviluppo di saggi ben standardizzati per la determinazione di batteri o sostanze tossiche. Gli anticorpi monoclonali, dopo aver rivoluzionato la ricerca bio-medica e la pratica diagnostica umana e veterinaria, stanno infatti cominciando a rivoluzionare anche l'analisi ed il monitoraggio agro-alimentare-ambientale, al punto che ci sembra giustificato parlare di una "nuova diagnostica" peculiare di questo settore. Gli anticorpi monoclonali sono ottenuti attraverso una serie di manipolazioni di laboratorio che iniziano con l'immunizzazione di un topo con l'antigene in studio e la rimozione della milza o di linfonodi periferici dall'animale dopo un periodo di tempo opportuno. Le cellule producenti gli anticorpi (i linfociti B) sono isolate dalla milza o dai linfonodi e sono fisicamente fuse con cellule di mieloma tenute in coltura (perché cellule tumorali e quindi capaci di proliferare *in vitro*) mediante polietilenglicole. Le cellule che

si formano dalla fusione delle cellule B con le cellule di mieloma sono chiamate "ibridomi" (essendo appunto cellule ibride ottenute solamente in laboratorio).

Attraverso una serie di manipolazioni di colture cellulari, i singoli ibridomi sono clonati, fatti proliferare e messi in condizione di produrre anticorpi. Gli anticorpi sono quindi definiti monoclonali perché prodotti *in vitro* da una popolazione di cellule clonate e perciò tutte identiche fra di loro. Gli anticorpi monoclonali, secreti nel terreno di coltura dagli ibridomi, sono selezionati per le caratteristiche desiderate di specificità, affinità, ecc., e, dopo purificazione con normali tecniche biochimiche, sono inseriti nel tipo di test EIA più adatto per l'analisi. Dato che una linea di ibridoma può essere tenuta in coltura continua oppure congelata e conservata in azoto liquido per essere rimessa in coltura in qualsiasi momento, si ha a disposizione una fonte, teoricamente inesauribile, di anticorpi con caratteristiche note e costanti. Da qui la possibilità di sviluppare test diagnostici agro-alimentari assolutamente standardizzati, nel tempo e in laboratori diversi, cosa che è spesso difficilmente realizzabile a costi ragionevoli con gli anticorpi policlonali tradizionali.

Gli EIA possono essere di due tipi: a **competizione** oppure **a *sandwich***.

In un saggio **competitivo** (Figg. 1a e 1b), è l'anticorpo oppure l'antigene ad essere immobilizzato sulla fase solida, mentre l'antigene o l'anticorpo marcato con l'enzima è aggiunto in soluzione assieme al campione da analizzare. Dopo aver raggiunto l'equilibrio ed aver eliminato con una fase di lavaggio i reagenti liberi, la reazione enzimatica è sviluppata mediante aggiunta di substrato. In un saggio **a *sandwich*** (detto anche "a doppio anticorpo", vedi fig. 2), ad un primo anticorpo (di cattura) immobilizzato alla fase solida, viene aggiunto il cam-

Figura 1a

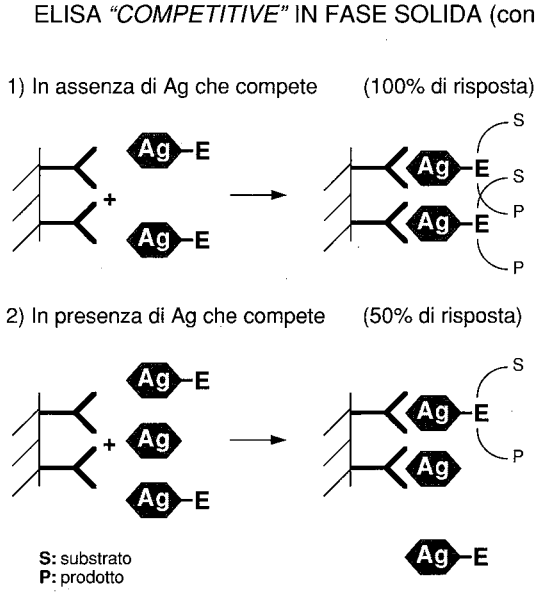
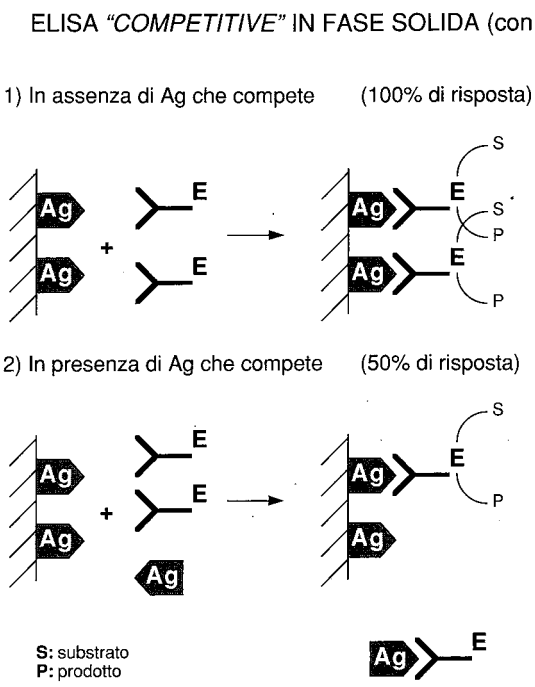


Figura 1b



pione contenente l'antigene, e poi il secondo anticorpo coniugatc (detto "anticorpo di rivelazione"). Dopo formazione del complessc "*sandwich*") fra i due anticorpi monoclonali e la molecola bersagli non legati sono eliminati dal lavaggio e la reazione enzimatica vier ta come prima. In un saggio competitivo, l'intensità del colore svil l'enzima è inversamente proporzionale alla concentrazione di a campione, mentre è direttamente proporzionale in un test a *sandv* competizione sono utilizzati nella determinazione di piccole molec micotossine, i pesticidi e gli antibiotici, mentre i saggi a *sandwich* soi ti per il controllo di microorganismi e di tossine batteriche.

A seconda del particolare tipo usato in un determinato saggio, la zione della reazioni di un EIA può farsi visivamente ad occhio nudo sticidi ed antibiotici) oppure mediante un lettore di ELISA per micro non è altro che un colorimetro destinato alla lettura di micropiastre ne).

I saggi attualmente disponibili per diagnostica, monitoraggio e gro-alimentare-ambientale possono essere raggruppati a seconda d ria di antigeni che essi determinano. Tutti comunque hanno le caratt offrono analoghi vantaggi di specificità, sensibilità, rapidità e facil

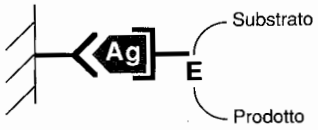
Figura 2

ELISA *"SANDWICH"*

1) Aggiunta dell'antigene

2) Aggiunta dell'anticorpo coniugato con l'enzima

3) Formazione a *"sandwich"* con l'antigene



zione e d'interpretazione, oltre a richiedere nessuna od una minima preparazione del campione e addestramento dell'operatore.

- **microorganismi:** *Salmonella, Listeria, Clostridium,* batteriofagi;
- **tossine biologiche:** micotossine (aflatossine, tossine di *Fusarium* come la vomitossina e la tossina T-2), enterotossine dello *Staphylococcus aureus;*
- **erbicidi, insetticidi e fungicidi:** triazine, ciclodieni, acido diclorofenossiacetico e derivati, paraquat, carbofuran, aldicarb, benomyl, ecc.;
- **antibiotici:** cloramfenicolo, tilosina, sulfametazina, sulfadimetossina, gentamicina, ecc.;
- **componenti degli alimenti:** proteine vegetali o animali, caseine, ecc.:
- **ormoni anabolizzanti:** steroidi;
- **patogeni delle piante e delle sementi:** virus, funghi e nematodi;

Cercheremo di esaminare in qualche dettaglio alcune di queste categorie, fornendo, per quanto possibile ed a noi noto, esempi concreti di test diagnostici commercialmente disponibili e delle loro caratteristiche. Va comunque sottolineato che quest'articolo non intende riassumere **tutta** la letteratura scientifica in cui siano stati descritti anticorpi o saggi immunologici per l'analisi agro-alimentare.

Salmonella e *Listeria*

Come esempi di test EIA, in rapida diffusione nel controllo alimentare di microorganismi patogeni, si devono citare quelli per salmonelle e per listeria.

Le **salmonelle** fanno parte della famiglia delle *Enterobacteriaceea*. Il genere *Salmonella* comprende quegli agenti responsabili di tossi-infezioni alimentari, di gastro-enteriti acute ed anche di febbri tifoidi e paratifoidi. Le enteriti da salmonella, associate a molti differenti sierotipi (degli oltre 1500 noti), come ad esempio: *S. typhimurium, S. newport, S. adelaide* ed altri, sono spesso designate con il termine generico di "intossicazioni alimentari". Le salmonellosi nell'uomo sono associate al consumo di alimenti contaminati direttamente o indirettamente da un animale infetto: suini, polli (uova), bovini, ecc. Al giorno d'oggi, i frequenti spostamenti delle persone e l'altissimo volume di scambio di prodotti commerciali alimentari, ha considerevolmente aumentato la difusione di sierotipi di salmonella patogeni fra vari paesi. Rigorose misure d'ordine sanitario e di monitoraggio sono quindi importanti per prevenire le enteriti causate da salmonella ed altre enterobatteriacee, quali il controllo di: acqua, latte e derivati, uova, carne e prodotti carnei, e perfino delle persone per non impedire a portatori di salmonella di operare a contatto di alimenti destinati al consumo.

Le infezioni umane ed animali si verificano generalmente al momento dell'ingestione di cibo e di acqua contenenti un numero di batteri sufficienti per stazionare e colonizzare l'intestino. La legislazione italiana, come quella della maggior parte degli altri Paesi, vieta la presenza di anche una sola salmonella in 25 g di campione solido oppure in 100 ml di campione liquido (Gazzetta Ufficiale n°346 del 1978).

La tecnica immunoenzimatica, applicata al controllo delle salmonelle, è da un lato un'innovazione importante rispetto alle tecniche microbiologiche tradizionali in termini di rapidà e facilità d'analisi; d'altro lato, l'uso di anticorpi monoclonali costituisce un fattore fondamentale in termini di affidabilità e riproducibilità del test. Un test EIA per il genere *Salmonella* basato su monoclonali è stato approvato fin dal 1986 dall'autorevole *Association of Official Analytical Chemists* (USA), il che equivale ad una sua rigorosa validazione ed ufficializzazione, oltre ad implicito riconoscimento da parte della *Food and Drug Administration*.

Prima di eseguire il controllo di salmonelle, i campioni da analizzare (fino a 92 con un singolo *kit*) vengono arricchiti per 48 ore circa, seguendo le metodiche ufficiali di arricchimento. In seguito, per la determinazione immunoenzimatica si impiegano meno di 2 ore, utilizzando una semplice strumentazione comune a tutti i test di questo tipo. Le fasi di esecuzione implicano: 1) distribuzione di aliquote di campione arricchito nei pozzetti della micropiastra; 2) inserimento nei pozzetti di una biglia metallica ricoperta di un anticorpo monoclonale anti antigene di salmonella ed incubazione; 3) lavaggio delle biglie per eliminare le particelle non fissate agli anticorpi; 4) aggiunta del secondo anticorpo monoclonale di rivelazione coniugato all'enzima e incubazione; 5) lavaggio delle biglie per eliminare l'eccesso di reagenti; 6) aggiunta del substrato per l'en-

zima; 7) lettura del risultato (colore verde: presenza di salmonelle; incolore: assenza di salmonelle). L'ormai vasta letteratura disponibile prova l'affidabilità e la specificità del test per il genere *Salmonella* (riconosce infatti tutti i sierotipi testati), in quanto il metodo EIA si correla con quello di coltura microbiologica ufficiale (BAM/AOAC) dimostrando la maggior affidabilità e precisione del primo. Più recentemente, il gruppo di Flowers (J. AOAC *71* (2), 341,1988) ha descritto una modificazione della fase di pre- e post-arricchimento e di arricchimento selettivo del campione alimentare da analizzare sperimentata su un certo numero di alimenti a basso contenuto di umidità (i campioni erano: 238 inoculati, 30 contaminati naturalmente e 30 non inoculati). Questi Autori hanno concluso che con il metodo EIA modificato si può completare un'analisi in 40 ore (inclusa la fase di preparazione del campione), senza necessità di eseguire centrifugazioni, e che questo metodo è più affidabile della coltura microbiologica nel determinare la presenza di salmonelle in polvere secca di formaggio, cioccolato, latte magro in polvere, ecc.

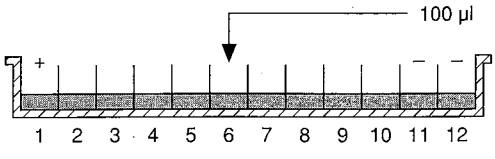
Il *kit* costituisce quindi un ottimo strumento di ricerca e di controllo nei prodotti alimentari, in quanto è più rapido e sicuro, oltre ad essere più economico dei metodi tradizionali nel controllo di routine con un alto numero di campioni da analizzare.

Listeria è un genere di batteri Gram-positivi, di piccole dimensioni a bastoncino, psicrofili, mobili a 22°C e non sporigeni. Questi organismi possono produrre l'enzima catalasi (che contribuisce alla decomposizione degli alimenti), vivono in presenza o in assenza di ossigeno e crescono entro un ampio *range* di temperatura (tra +1 e +45°C), quindi anche in condizioni di refrigerazione e di maturazione dei prodotti alimentari. Siccome molti cibi refrigerati hanno una scadenza piuttosto breve prima di dover essere consumati, è particolarmente necessario un metodo rapido e facile per determinare la presenza di listeria negli alimenti ed in genere negli impianti di trasformazione e preparazione alimentare. Nella listeriosi umana, la sintomatologia comprende: infezioni di tipo influenzale, mal di gola, gonfiore ghiandolare e monocitosi, ecc. Delle sette specie di listeria attualmente riconosciute, solo la *L. monocytogenes* è patogena per l'uomo, provocando sintomi sub-clinici di tipo influenzale. Tuttavia può causare polmoniti, setticemie, infiammazioni purulente a livello delle mucose, endocarditi e meningiti con percentuale di mortalità fino al 40 %, soprattutto nei neonati, nelle persone anziane e negli individui immunocompromessi. L'ampio spettro di condizioni di crescita di questo microorganismo e la sua patogenicità fanno della *Listeria monocytogenes* un potenziale pericolo per il consumatore. Il latte, i prodotti lattiero-caseari ed i prodotti carnei sono i più frequenti vettori di contaminazione da listeria. Recenti indagini condotte da industrie di trasformazione delle carni in USA, hanno permesso di evidenziare la presenza di listeria in oltre il 20% dei prodotti analizzati, a base di carne. Nel corso del 1987, sono stati segnalati diversi casi di listeriosi con decorso spesso mortale sia in Europa sia negli Stati Uniti e nel Canada. Una prevenzione efficace delle listeriosi umane richiede quindi un controllo sistematico dei prodotti alimentari potenziali vettori di infezione.

I metodi convenzionali di coltura delle listerie sono alquanto costosi, lunghi

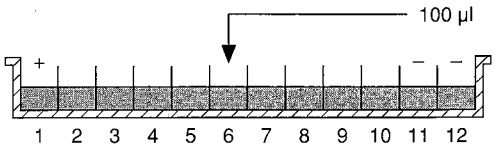
Figura 3 - **Determinazione di listeria: metodo EIA**

1 - Distribuzione dei campioni



Distribuire: 100 µl riferimento positivo (pozzetto n° 1)
100 µl riferimento negativo (pozzetti n° 11, 12)
100 µl di ogni campione (uno per pozzetto)

2 - Aggiunta del coniugato



Aggiungere 100 µl di anticorpo coniugato in ogni pozzetto

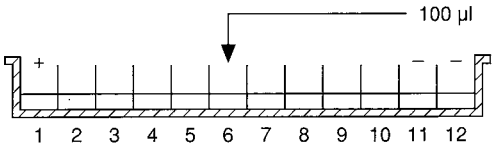
3 - Incubazione: formazione del complesso Ab1/Ag/Ab2-enzima

Sigillare ogni modulo con l'adesivo per micropiastre ed agitare dolcemente
Incubare per 1 ora a 37 °C.

4 - Lavaggio

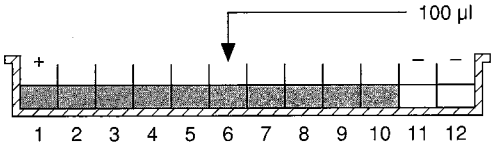
Lavare ogni pozzetto per sei volte con 200 µl di tampone.

5 - Aggiunta del substrato



Distribuire 100 µl del substrato in ogni pozzetto
Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente

6 - Arresto della reazione



Aggiungere 100 µl della soluzione di arresto in ogni pozzetto
Leggere il risultato a 450 nm azzerando lo strumento contro aria.

Se l'assorbanza (Abs) del riferimento positivo (pozzetto n° 1) è ≥ 0,70 e quella dei riferimenti negativi (pozzetto n° 11 e 12) ≤ 0,30, calcolare la soglia di positività secondo la formula:

$$\frac{\text{Abs pozzetto 11} + \text{Abs pozzetto 12}}{2} + 0{,}15$$

e di difficile interpretazione. Il primo test ELISA per il genere *Listeria* è commercialmente disponibile dal dicembre 1987 ed è basato su anticorpi monoclonali specifici per gli antigeni di *Listeria*, offrendo un metodo di determinazione sensibile, specifico, rapido e di facile interpretazione (J.A. Mattingly *et al.*, *J. AOAC 71*(3), 679-681, 1988). Il test utlizza un primo anticorpo monoclonale di cattura immobilizzato ai pozzetti di una piastra di microtitolazione ed un secondo monoclonale di rivelazione coniugato all'enzima di rivelazione, come schematizzato in figura3. La procedura prevede una fase di 48 ore di pre-arricchimento del campione alimentare, è estremamente semplice e quindi alla portata di tutti i tecnici e degli operatori dell'industria alimentare o dei laboratori di controllo. L'affidabilità del test è in via di rigorosa valutazione in USA nell'ambito di uno studio collaborativo dell'AOAC, ma da alcuni risultati pubblicati dal gruppo di Mattingly si deduce che 10 campioni su 20, risultati negativi alla prima analisi colturale, sono invece risultati positivi dopo diverse settimane di coltura e sub-coltura, mentre tutti e venti sono risultati positivi e come tali confermati all'analisi EIA.

Clostridium

Le specie di *Clostridium* comprendono bacilli tellurici a forma di bastoncino, Gram-positivi, sporigeni, in maggior parte mobili e anaerobi obbligati, non patogeni per l'uomo. I clostridi del gruppo butirrico sono produttori di aldeidi, alcooli, acido acetico e butirrico, e dei gas H_2 e di CO_2 (causa del cosiddetto gonfiore tardivo dei formaggi a lunga maturazione, il che può a volte dare origine perfino allo "scoppio" delle forme in stagionatura). Sono soprattutto i formaggi a pasta dura o semi-dura ad essere suscettibili di questo tipo di incidente di produzione. In breve, un formaggio a pasta dura viene prodotto nel seguente modo: dopo aggiunta al latte di caglio per provocare la coagulazione della caseina, la cagliata viene tagliata e scolata. Segue un processo di agitazione e di pressaggio (eventualmente di cottura in certi casi, come per l'Emmenthal), ed infine di maturazione e stagionatura in sale apposite. Non è quindi la loro patogenicità il motivo per cui le spore di clostridi devono essere ricercate nel latte usato in certe produzioni casearie, quanto i seri danni economici che sono in grado di causare alle industrie casearie.

Le spore di clostridi nel latte originano da: suolo (loro terreno di crescita naturale in cui le spore possono essere presenti in concentrazioni da migliaia a decine di migliaia per grammo), foraggi insilati contaminati da suolo contenente spore (un insilato viene ottenuto per fermentazione lattica di fieno umido e conservato in condizioni anaerobiche) e feci animali contaminanti la raccolta, trasporto o conservazione del latte. Il trattamento di latte contaminato da spore di clostridi butirrici può essere eseguito con metodi fisici, chimici, biochimici o biologici, i quali comunque presentano problemi di costo, di possibile alterazione delle proprietà organolettiche del latte e di scarsa praticità soprattutto per le moderne scale di produzioni casearie. Il miglior approccio al problema è quindi la **prevenzione**, che si pratica con: buona produzione ed uso di foraggi insilati, uso di contenitori puliti e adozione di rigorose condizioni igieniche nella raccolta e nelle successive fasi di lavorazione del latte.

Attualmente, la determinazione precoce delle spore nel latte per caseificazione si effettua mediante:
- **esame microscopico**: lungo, soggettivo e poco affidabile;
- **metodo batteriologico**: facile ed economico, ma estremamente lungo, scarsamente efficiente e basato su un calcolo di probabilità;
- **metodo immunologico**: rapido, facile da eseguire, oggettivo ed accurato.

Il classico metodo batteriologico BBB (da Bryant-Burkey, modificato da Bergère) consiste nello stimare il numero più probabile di spore presenti in un volume unitario di latte, usando un terreno di coltura selettivo contenente i promotori di germinazione delle spore di *Cl. tyrobutyricum* (es., lattato, acetato ed estratto di carne). Provette da coltura vengono inoculate con diverse diluizioni di latte e terreno BBB, addizionate quindi di una soluzione mista di paraffina-olio di paraffina, ed incubate prima brevemente a 75 °C e poi per sette giorni a 37 °C. La presenza di spore nel latte viene dedotta dal sollevamento del tappo del tubo di almeno 1 cm, il che è dovuto alla produzione di gas da parte dei batteri sviluppatisi dalla germinazione delle spore. Infine, il numero di provette trovate positive è usato per stabilire il numero più probabile di spore di clostridi presenti in 1 litro di latte. E' evidente che, anche se semplice da eseguire senza necessità di complesse apparecchiature, il metodo è lungo (il latte analizzato è immesso in caseificazione **prima** che il risultato dell'analisi sia noto), poco specifico ed accurato.

Il test immunoenzimatico di prima generazione per la determinazione nel latte di spore vitali di *Cl. tyrobutyricum*, *Cl. butyricum* e *Cl. sporogenes*, utilizza un anticorpo policlonale di coniglio ottenuto contro spore vegetative di clostridi, viene eseguito in 24 ore (invece di 7 giorni), e permette di eseguire valutazioni quantitative in maniera oggettiva. Il saggio si svolge in quattro passaggi principali:
a- estrazione delle spore dagli aggregati, mediante emulsione del grasso ed idrolisi di caseina e delle cellule somatiche;
b- filtrazione del latte per catturare le spore su una membrana sintetica;
c- incubazione della membrana su un terreno agarizzato per 24 h a 37 °C in condizioni anaerobiche per far germinare le spore e permettere la moltiplicazione dei batteri;
d- rilevazione e conta delle micro-colonie formate dalle spore vegetative (una spora germinata dà origine a 10^5-10^6 cellule) mediante un secondo anticorpo di capra anti-IgG di coniglio coniugato alla perossidasi e sviluppo della reazione enzimatica.

Il risultato si interpreta al microscopio ottico osservando il filtro e contando i "puntini" presenti, in cui ogni "puntino" sul filtro rappresenta una colonia di cellule vegetative di clostridi. Il test EIA permette di determinare una concentrazione di spore di clostridi uguale o superiore a 100 spore per litro di latte.

Enterotossine dello *Staphylococcus aureus*

L'intossicazione alimentare da stafilococco è causata dall'ingestione di una o più di una serie di proteine a basso peso molecolare (25-30.000 daltons) denominate enterotossine e prodotte da determinati ceppi di *Staphylococcus aureus*.

Lo sviluppo rapido (in 1-6 ore) di sintomi quali: nausea, vomito, dolori addominali e diarrea, sono caratteristici di questo tipo di intossicazione alimentare. In casi particolarmente gravi, possono sopraggiungere: disidratazione, emicranie, crampi muscolari, cali di pressione, ecc. L'intossicazione da enterotossine stafilococciche può essere causata da una gran varietà di alimenti e di cibi preparati, spesso in relazione con le abitudini alimentari di ogni Paese, quali: la carne di maiale cotta ed i *dessert* a base di crema in USA, polpette di riso ed altri cibi tipo *sushi* in Giappone, ed inoltre: affettati di carne, prodotti lattiero-caseari, insalate con maionese, gelati, ecc., soprattutto se preparati a mano (il tratto rinofaringeo e la pelle sono notoriamente serbatoi di *Staph. aureus* nell'uomo). I cibi conservati a temperature che permettono la crescita batterica, possono contenere più di un milione di cellule di *Staph. aureus* per grammo, ma, anche se molti ceppi sono in grado di produrre le enterotossine (cioè sono enterotossigenici), non è sufficiente la determinazione microbiologica del batterio per appurare il rischio di intossicazione alimentare, bensì è necessario dosare le enterotossine stesse.

Le enterotossine stafilococciche formano un gruppo di sette proteine sierologicamente distinte, designate A, B, C1, C2, C3, D ed E (abbreviate da SE-A a SE-E), di peso molecolare molto simile. Sono resistenti alla maggior parte degli enzimi proteolitici, il che le rende in grado di essere esposte ad enzimi digestivi senza perdita di attività biologica. Vi sono anche diverse evidenze indicanti che l'attività immunologica e tossica delle enterotossine è stabile al trattamento termico (la SE-C è più resistente di SE-A e di SE-B). I ceppi di *Staph. aureus* producenti SE-A od entrambe SE-A e SE-D sono responsabili di oltre il 70% dei casi di intossicazione, mentre SE-D oppure SE-D più SE-C del 10%.

Fino alla messa a punto di metodi pratici e sensibili per la determinazione di enterotossine stafilococciche, queste molecole venivano identificate come possibili agenti di intossicazione alimentare attraverso l'isolamento di colonie di *Staph. aureus* coagulasi-positive da cibi sospetti di essere contaminati e, in alcuni casi, dimostrando la produzione di enterotossine in terreni di coltura di laboratorio. Tuttavia, è un metodo poco pratico, oltre ad essere impreciso in quanto non vi è prova convincente di una stretta correlazione fra positività per coagulasi e produzione di enterotossine. D'altra parte, il trattamento al calore di un prodotto alimentare può eliminare tutte le cellule di *Staph. aureus* presenti, senza distruggere le enterotossine; il miglior modo quindi per appurare se un prodotto alimentare è un veicolo di tossinfezione stafilococcica è quello di determinare direttamente la presenza di enterotossine. Dato che non esistono metodi chimici di determinazione di queste molecole proteiche, i metodi utilizzabili sono biologici oppure immunochimici. I primi sono costosi, difficili da eseguire e da interpretare, mentre i secondi si stanno affermando come l'unico metodi di dosaggio delle enterotossine di *Staph. aureus.*

Molti metodi immunologici sono stati descritti per le enterotossine (immunodiffusione singola o doppia, immunoelettroforesi, emoagglutinazione, RIA), ma sono i sistemi EIA ad apparire i più pratici e convenienti (vedi: H.S. Tranter *et al.*, in "Natural Toxicants in Food: Prospects and Prospects" D.H. Watson, ed., 1987: cap. 6). Dei diversi sistemi EIA descritti in letteratura (vedi in: S. Ewald, Int. J. Food Microbiol. *6*, 141, 1988). Il più sofisticato, preciso e sensibile

sembra essere un test di recente sviluppo basato su un formato *dipstick* fornito di 6 pozzetti ,ad ognuno dei quali è immobilizzato un monoclonale specifico per SE-A, SE-B, SE-C, SE-D e SE-E, mentre il sesto serve da controllo negativo e contiene un monoclonale non-specifico (vedi fig.4).

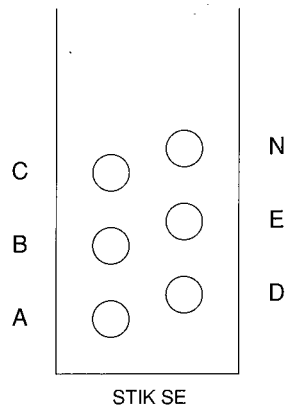
Per l'esecuzione del test, 25 gr del campione alimentare vengono preparati con un trattamento acido/base ed un'estrazione al cloroformio. Segue una centrifugazione ed il *dipstick* viene immerso nell'estratto acquoso. Dopo 45 minuti di incubazione, in cui enterotossine eventualmente presenti si legano al corrispondente monoclonale, lo *stick* viene lavato ed immerso in una soluzione-*cocktail* dei cinque monoclonali specifici di rivelazione ed uno non-specifico di controllo, tutti coniugati all'enzima fosfatasi alcalina. Dopo un ulteriore lavaggio, si sviluppa la reazione enzimatica che permette di visualizzare un colore blu-porpora in corrispondenza del pozzetto dove si è legata un'enterotossina (si forma un *sandwich*, come in fig.2). L'analisi completa si effettua in 90 minuti circa e la sensibilità del saggio è di 0,5 ng/ml di ogni enterotossina.

Il test è disponibile sotto forma di *kit* completo di tutti i reagenti necessari ad eseguire l'analisi e permette di determinare contemporaneamente la presenza di una o più enterotossine in un campione alimentare.

Micotossine

Le micotossine sono metaboliti secondari (chimicamente si tratta di composti organici di peso molecolare relativamente basso) prodotti in particolari circostanze da alcuni ceppi di funghi microscopici (cioè di muffe, quali: *Aspergillus, Fusarium, Penicillium*, ecc.). In natura, la loro produzione non è uniforme in tutti i ceppi di una specie associata con la loro biosintesi; anche nel caso di un ceppo producente, la biosintesi di una determinata micotossina può essere molto sensibile alle condizioni ambientali e nutrizionali in cui il fungo si viene a trovare.

Figura 4 - **Test ELISA per la determinazione delle enterotossine di *Staphylococcus aureus* (SE-EIA)**



Il *kit* SE-EIA è composto da uno stik sul quale sono ricavati 6 pozzetti ricoperti con anticorpi monoclonali (MAb) specifici:

Pozzetto A: MAb per enterotossina tipo A
Pozzetto B: MAb per enterotossina tipo B
Pozzetto C: MAb per enterotossina tipo C (C1, C2, C3)
Pozzetto D: MAb per enterotossina tipo D
Pozzetto E: MAb per enterotossina tipo E
Pozzetto N: MAb non specifico (controllo negativo)

Coniugato: miscela dei MAb coniugati con fosfatasi alcalina

Le micotossicosi umane descritte con maggior frequenza sono le seguenti:
- da **aflatossina**: epatocarcinogenesi, sindrome di Reye, cirrosi infantile, encefalopatia;
- da **amatossine, agaritina, falotossina, amanitine**: *kwarshiorkor*, intossicazione da funghi;
- da **alcaloidi di *Claviceps***: ergotismo;
- da **ocratossine**: nefropatia balcanica, tumori renali;
- da **tricoticeni** (T-2, vomitossina, ecc.): ATA, cancro del tratto esofageo, ecc.
- da **zearalenone**: cancro cervicale.

Nonostante la scarsità di correlazioni che provino rigorosamente l'implicazione di micotossine in alcune malattie umane, numerosi dati tossicologici ed epidemiologici indicano che il gruppo delle aflatossine, ad esempio, è causalmente implicato nello sviluppo di forme di cancro epatico primario, forse agendo in sinergismo con il virus dell'epatite B. L'aflatossina potrebbe anche agire come co-fattore del virus e rappresentare uno dei maggiori fattori di rischio nella insorgenza di epatite.

Non sono stati condotti studi approfonditi per valutare i costi economici associati alla contaminazione da micotossine negli alimenti e nei mangimi. Le poche stime disponibili indicano che tali costi sono altissimi. Le perdite in termini di esportazione di soli cinque tipi di cereali suscettibili di contaminazione da micotossine (riso, mais, orzo, semi di cotone ed arachidi) potrebbe essersi avvicinato ai 2 miliardi di dollari nel solo 1985. Se si considerano quali potrebbero essere i costi a livello mondiale, e se si aggiungono quelli delle cure cliniche, quelli dovuti ad aborti spontanei in animali da produzione, alle perdite di peso, ecc., c'è da concludere che il danno economico dovuto alle contaminazioni da micotossine è davvero immenso, il che giustifica un grosso sforzo di ricerca nello sviluppo di metodi analitici del loro monitoraggio per poter attuare rigorosi controlli e misure di prevenzione.

Principali micotossine
per cui sono stati approntati test immunoenzimatici competitivi

Aflatossine
prodotte da: *Aspergillus flavus* ed *Aspergillus parasiticus*;
specie principali: B1, B2, G1, G2 e M1 (metabolita della B1 presente nel latte);
alimenti contaminati: mais, arachidi, noci, pecan, ecc.;
effetti cronici nell'uomo: cancro epatico, epatite B (?).

Tricoticeni (Vomitossina e T-2)
prodotti da: *Fusarium, Trichoderma,* ed altre muffe;
specie principali: (oltre 80 composti noti): vomitossina, nivalenolo, T-2;
alimenti contaminati: mais, miglio, orzo, altri cereali;
effetti tossici nell'uomo: ATA (aleukia tossica alimentare), disordini immunitari, carcinogenicità.

Ocratossine
prodotte da: *Aspergillus ochraceus* ed altre muffe;
specie principali: ocratossina A e B;
alimenti contaminati: cereali, caffè, soja, cacao ed altre bacche;
effetti cronici nell'uomo: nefropatia endemica.

Zearalenone
proddotti da: varie specie di *Fusarium*;
alimenti contaminati: mais, frumento, orzo, avena, sorgo;
effetti cronici nell'uomo: iperestrogenismo e le sue *sequelae*.

Aflatossine

Le **aflatossine B1, B2, G1, G2**, sono sostanze prodotte in certe condizioni da alcuni ceppi di funghi filamentosi del genere *Aspergillus*, i quali sono possibili contaminanti di molte derrate alimentari. I prodotti agricoli più soggetti a contaminazione da aflatossine sono: i semi oleaginosi (soja, arachidi, ecc.), i cereali e le farine. Le aflatossine, in particolare la B1, sono dannose per la salute umana ed animale poiché causano necrosi ed hanno un alto potere cancerogeno, con un tropismo prevalentemente epatico.

In diversi Paesi, rigorose normative governative stabiliscono i livelli massimi consentiti di aflatossine nei prodotti alimentari per uso umano o animale. I metodi cromatografici comunemente utilizzati per la rilevazione ed il dosaggio delle aflatossine richiedono complesse procedure di estrazione e/o l'utilizzo di apparecchiature sofisticate e costose. Inoltre, è necessario impegnare personale di laboratorio altamente specializzato per eseguire le analisi e mantenere la buona efficienza della strumentazione. Negli ultimi anni, alcuni laboratori sono riusciti a produrre anticorpi policlonali e monoclonali specifici per aflatossine. Questi anticorpi hanno permesso lo sviluppo di metodi di determinazione rapida, utilizzando la tecnica dei saggi immunologici.

Alcuni *kit* di dosaggio sono basati su una reazione immunoenzimatica a competizione, la quale utilizza un anticorpo monoclonale che riconosce specificamente la struttura chimica delle aflatossine. Aliquote di estratti dei campioni da dosare e di un certo numero di soluzioni standard (fornite con il *kit*) sono distribuite in pozzetti di una micropiastra sensibilizzati con aflatossina B1. Viene quindi aggiunta una determinata quantità di anticorpo monoclonale coniugato all'enzima perossidasi. Se nel campione sono presenti delle aflatossine, esse si legano all'anticorpo ed impediscono, per un fenomeno di competizione molecolare, che questo si leghi all'aflatossina fissata alla micropiastra (il formato del test è quindi quello della fig. 1b). Il complesso "aflatossina libera-anticorpo coniugato" formato in soluzione, viene eliminato con un successivo ciclo di lavaggio. La quantità di anticorpo residuo legato alla micropiastra è determinata dalla misura dell'attività dell'enzima coniugato, che trasforma un substrato specifico in un prodotto colorato. La quantità di anticorpo fissato è inversamente proporzionale alla quantità di aflatossina presente nel campione o nella soluzione standard.

Quindi, maggiore è la quantità di aflatossina nel campione, minore è l'intensità del colore nel pozzetto. La determinazione di aflatossine con un test EIA si

ottiene in poco più di 30 minuti e permette di raggiungere una sensibilità fino a 1 ppb.

L'**aflatossina M1** (AFM1) viene ritrovata nel latte di animali che abbiano consumato mangimi contaminati con aflatossina B1 (il metabolita prodotto dall'*Aspergillus*). La AFM1 è il derivato idrossilato dell'AFB1, di cui conserva l'alta tossicità cancerogena. Da qui l'assoluta necessità di limitarne la presenza a bassissime concentrazioni in prodotti caseari destinati all'alimentazione umana, soprattutto dei bambini e degli anziani. I metodi tradizionalmente impiegati per la determinazione di AFM1, come d'altra parte per le altre micotossine note, sono la TLC e la HPLC, che permettono di raggiungere limiti di sensibilità di 0,05 µg/kg con il latte in polvere e di 10 pg/ml nel latte. La praticità di questi metodi è tuttavia scarsa, mentre la recente produzione di anticorpi monoclonali altamente specifici per AFM1 ha permesso la messa a punto di un EIA competitivo sullo stesso formato di quello per AFB1. Anche se la AFM1 non può essere determinata direttamente nel campione da analizzare senza un passaggio di estrazione, purificazione e concentrazione, l'uso di cromatografia in fase inversa su colonnine di *gel* di silice C18 oppure di cromatografia di immunoaffinità, permette, una volta completata l'estrazione, l'analisi di 36 campioni con una singola micropiastra di 12x8 pozzetti in circa 40 minuti (Kornfeld *et al.*, in corso di stampa).

Tricoticeni

I **tricoticeni** comprendono una famiglia di sesquiterpenoidi con struttura chimica molto simile, prodotti da diversi funghi filamentosi e classificati in quattro gruppi da A a D. Micotossine naturali, come la T-2 e la DAS (del gruppo A) sono ritenute associate a diverse micotossicosi dell'uomo e degli animali con varia sintomatologia: lesioni della pelle, lesioni emorragiche degli organi interni, emesi, vomito, leucopenia, ecc.. Essendo molecole con scarse caratteristiche spettrali (es., non sono naturalmente fluorescenti), anche la loro separazione per TLC, HPLC o GC-MS, ne rende difficile la determinazione. La produzione di anticorpi, policlonali e monoclonali, specifici per diverse micotossine della classe dei tricoticeni, ha permesso a diversi gruppi di ricerca lo sviluppo RIA prima e di EIA poi con le caratteristiche più volte citate ottenibili con tecniche immunochimiche. Come nel caso della AFM1 (vedi sopra), anche per la T-2 è necessario un passaggio di estrazione del campione con acetonitrile e di purificazione su una colonnina C18 prima di eseguire l'analisi EIA con un monoclonale anti T-2 che permette di raggiungere sensibilità di 1,5 ppb in campioni di mangimi composti.

Ocratossine

Le **ocratossine** (A, B, C) sono metaboliti tossici prodotti da vari ceppi di funghi *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium vividicatum*. L'ocratossina A è ritenuta responsabile di una grave forma di nefropatia, endemica nei paesi balcanici. Le tecniche cromatografiche tradizionali raggiungono una sensibilità di 5 ppb o superiori, ma, oltre ai soliti problemi di strumentazione e di competenze tecniche richieste all'operatore, necessitano di lunghe procedure di purificazione del campione per eliminare molti pigmenti ed altri composti estratti assieme alla

tossina che interferiscono con la misurazione ottica. Il metodo EIA eseguito con un monoclonale anti-ocratossina A è di rapida esecuzione, e usando lo stesso formato di test delle altre micotossine permette di raggiungere una sensibilità di 20 ppb direttamente nel campione estratto con acetonitrile (previa diluizione del solvente) e di 1 ppb dopo purificazione per cromatografia in fase inversa (S. Kornfeld, comunicazione personale).

E' evidente quindi che non solo il monitoraggio delle micotossine, ma la stessa ricerca fondamentale sulla loro presenza in diversi substrati biologici, sul meccanismo della loro biosintesi da parte dei ceppi di funghi produttori e sulla loro azione tossica negli animali e nell'uomo stanno ricevendo un nuovo impulso grazie all'applicazione di tecniche immunochimiche. E' perfino pensabile di eseguire in un futuro non lontano l'analisi immunoenzimatica contemporanea di diverse micotossine nell'estratto del medesimo campione di alimento. Si userà una piastra composta di moduli sensibilizzati ognuno alla micotossina che si intende determinare, aggiungendo il corrispondente monoclonale specifico coniugato all'enzima di rivelazione, il tutto sfruttando una semplice automazione oramai routinaria nei laboratori di diagnostica umana.

La possibilità di disporre di metodologie EIA semplici, rapide ed accurate per la determinazione di micotossine, soprattutto di aflatossine, in fluidi biologici permette altresì un accurato monitoraggio diagnostico della presenza di queste sostanze estremamente tossiche nell'urina o nel siero di individui e di animali da produzione esposti a contaminazione attraverso il ciclo alimentare. I livelli di micotossine nell'urina o nel siero dovrebbe permettere di estrapolare i probabili livelli di micotossine accumumlate in carni, uova e latte. Questo metodo d'analisi potrebbe diventare quindi utile non solo al laboratorio di controllo alimentare, ma anche all'epidemiologo clinico ed al veterinario impegnati nella diagnostica e profilassi (A. Wilkinson *et al.* ,Food Additives and Contaminants, *5*, 609-610, 1988; A.P. Wilkinson *et al.* , Human Toxicol., *7*, 353-356, 1988). In ultimo, vanno citati i lavori di ricercatori dell'Ist. Superiore di Sanità di Roma, i quali hanno osservato un effetto sinergico nell'accumulo di micotossine in organi (fegato e reni) e carne di polli (particolarmente di *broilers*) alimentati con mangimi contenenti due micotossine quali aflatossina ed ocratossina (C. Micco *et al.*, Food Additives and Contaminants, *5*, 309-314, 1988).

Antiparassitari ed antibiotici

Nel campo della determinazione di residui di antiparassitari nell'acqua, nel suolo, nei mangimi e negli alimenti, il potenziale analitico e di monitoraggio dei saggi immunologici è oramai sufficientemente riconosciuto al punto che l'*Office of Technology Assessment (OTA)* del Congresso USA vi dedica un intero capitolo (*Chapter 4, Immunoassay: an Emerging Technology*) nel suo ultimo rapporto intitolato: *"Pesticide Residues in Food: Technologies for Detection"*, pubblicato nell'Ottobre 1988. L'OTA mette in evidenza il fatto che anticorpi possono essere sviluppati per identificare singoli pesticidi oppure, in alcuni casi, gruppi o famiglie di molecole simili. Inoltre, i saggi immmunologici possono fornire dati

quantitativi simili a quelli ottenuti con tecniche analitiche convenzionali, oppure qualitative o semiquantitative, a seconda della precisione e sensibilità richieste, oltre che delle circostanze in cui l'analisi viene eseguita (cioè in campo oppure in laboratorio) e della strumentazione disponibile. Anche se nessun EIA per antiparassitari è stato ancora validato o ufficializzato, sia il FSIS americano (*Food Safety Inspection Service*) sia il CDNHW (*Canada's Department of National Health and Welfare*) deputato in Canada al controllo dei pesticidi negli alimenti, sono attivamente impegnati in R&S e studi di validazione di test sviluppati da diversi laboratori.

La messa a punto di un saggio immunoenzimatico per un pesticida non è cosa semplice. I pesticidi sono infatti in maggioranza molecole troppo piccole per indurre in quanto tali la produzione di anticorpi in un animale. La molecola dev'essere quindi prima coniugata ad una molecola *carrier* (spesso una proteina) per diventare immunogenica. Gli antiparassitari vanno quindi considerati, dal punto di vista immunologico, come degli apteni, alla stessa stregua delle micotossine, degli steroidi anabolizzanti, ecc. La sintesi chimica del coniugato aptene-*carrier* è generalmente considerato il fattore più importante per ottenere anticorpi (poli- o monoclonali) a scopi analitici, richiede competenza e contribuisce sostanzialmente al costo di sviluppo di un immunosaggio.

I test EIA per antiparassitari attualmente disponibili sono tutti di tipo competitivo nel formato schematizzato in figura 1a, in cui l'anticorpo è immobilizzato alla fase solida. In ogni caso, la relazione fra concentrazione di pesticida e intensità del colore sviluppato dalla reazione enzimatica è di proporzionalità inversa. Per certe misurazioni (es., nell'analisi di suolo o tessuti vegetali), è necessario un passaggio di estrazione e/o di purificazione del campione, mentre per acqua o soluzioni acquose (es., succhi di frutta o estratti vegetali) il saggio può essere effettuato direttamente. Nel campo degli antiparassitari, vi è un'intensa attività di ricerca a livello mondiale per incorporare anticorpi antiparassitari in biosensori e condurre studi di monitoraggio in continuo di acque, scarichi e processi industriali di trasformazione alimentare (vedi: J.H.T. Luong *et al.* TIBTECH *6*, 310, 1988).

Gli immunosaggi sono particolarmente adatti per la determinazione di pesticidi polari, solubili in acqua e dei loro prodotti di degradazione, che sono generalmente difficili da analizzare usando tecniche convenzionali, ma sono soprattutto da 4 a 5 volte più rapidi delle tecniche cromatografiche convenzionali. Infatti, non solo la preparazione del campione può non essere necessaria od essere minima, ma per analisi semiquantitative occorrono solo 5-10 minuti per ottenere il risultato. Se invece si usa un formato di test basato su micropiastra ed un lettore di ELISA, da 20 a 50 campioni di frutta od altri vegetali possono essere analizzati in triplicato in un giorno lavorativo, preparazione ed estrazione incluse. Anche in questo caso, la robotica in sviluppo in laboratori di diagnostica clinica potrà venire in aiuto per aumentare il volume d'analisi ed il numero di campioni trattati dai laboratori di controllo alimentare ed ambientale. I test EIA commercialmente disponibili sono elencati in tab. I, da cui è evidente che gli antiparassitari rappresentati includono diserbanti (triazine e 2,4-D), insetticidi (ciclodieni), nematocidi (aldicarb), fungicidi (benomyl) ed acaricidi (carbofuran), l'intero spettro quindi di pesticidi usati in agricoltura. Da notare che la

sensibilità del test per atrazina attualmente disponibile è stata portata a 0,1 ppb nell'acqua per ottemperare alle direttive CEE che anche l'Italia ha recentemente accettato. Le prestazioni del test per l'analisi di residui di atrazina nel suolo e nell'acqua sono state documentate in una recente pubblicazione di Bushway *et al.* (Bull. Environ. Contam. Toxicol. *40*, 647, 1988).

L'interesse del tossicologo e del veterinario in test rapidi per pesticidi è sia per monitorarne il loro accumulo in tessuti o fluidi biologici sia per determinarne la presenza nell'urina onde risalire al grado di esposizione ad un particolare principio attivo. Ad esempio, in una recente pubblicazione un gruppo di ricercatori finlandesi ha misurato i livelli di metaboliti dell'atrazina escreti nell'urina di ratti e di addetti all'applicazione dell'erbicida su linee ferroviarie, concludendo che la somma dei metaboliti urinari nel ratto e nell'uomo riflette quantitativamente l'esposizione all'atrazina (R. Ikonen *et al.*, Toxicology Letters , 44, 109-112, 1988).

Come esempio invece di risultati ottenuti con succhi e concentrati di frutta, sono riportati in tab II i dati di Ferguson *et al.* ottenuti con il test EIA per benomyl (un fungicida benzimidazolinico sistemico) ed il suo metabolita principale MBC (metil-2-benzimidazolecarbamato). Il test si può completare in 30 minu-

Tabella 1 - ***Kits* ELISA disponibili in commercio per la ricerca dei pesticidi**

Pesticidi	**Soglia di sensibilità dichiarata**	**Acqua e matrice alimentare**	**Casa produttrice**
Paraquat	100 ppb	acqua	Environmental Diagn. Inc. Burlington, NC
Triazine (atrazine, simazine, promazine)	1 ppb	acqua, latte, succhi vegetali e di frutta	ImmonoSystems Inc. Biddeford, ME
Chlordano derivati (chlordane, heptachlor dieldrin, aldrin, endrin, endosulfan)	1 ppb 200 ppb	acqua birra	
Benomyl	500 ppb	acqua, succhi concentrati di arancio e uva	
Carbofuran	1 ppb 25 ppb 100 ppb	acqua succo d'uva riso	
2,4-D	1 ppb 100 ppb	acqua birra	
Triazine	vedi sopra		Westinghouse Bio-Analytic Systems CO. Rockville, MD
Aldicarb	10 ppb	acqua e anguria	
Carbofuran	10 ppb	acqua	
Parathion	10 ppb	acqua e succo di frutta	
Pentachlorophenol	10 ppb	acqua	

Da: "Pesticide Residues in Food - Technologies for Detection" Office of Technology Assessment, October 1988.

ti, 8 campioni possono essere analizzati con un colorimetro portatile e la concentrazione di MBC è lineare da 1 a 26 ppb ovvero da 100 a 2600 pg/tubo, che equivale ad un limite di sensibilità di 10 ppb in succhi e di 30 ppb in concentrati. Come si può dedurre dalla tab. II, vi è una buona correlazione fra il test EIA e la cromatografia liquida convenzionale.

D'altra parte, le tecniche immunologiche possono **non** essere applicabili nel caso di molecole fortemente polari o di molecole di pesticidi estremamente piccole (e quindi non immunogeniche neppure in quanto apteni) come sembra essere il caso con certi tiocarbammati ed organofosfati. In questo caso esistono test di inibizione enzimatica, come quello descritto più sopra basato sull'enzima acetilcolinesterasi (per parathion e malathion) in cui maggiore è la concentrazione del pesticida, minore sarà l'attività della reazione enzimatica.

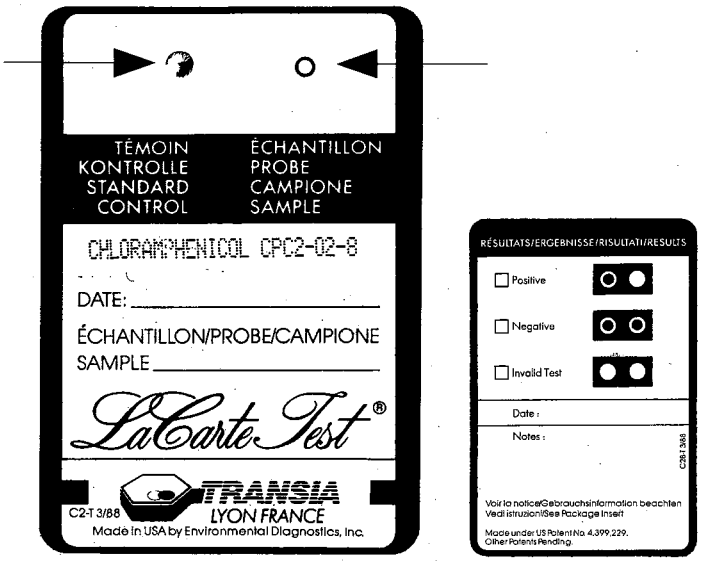
In definitiva, l'OTA conclude nel suo rapporto che i saggi immunologici quantitativi e qualitativi potranno sostituire le meno pratiche tecniche d'analisi di singoli residui di antiparassitari, aumentare il numero di campioni analizzati da un singolo laboratorio, essere utilizzati in campo, alla linea di produzione o di distribuzione, ed aumentare in generale lo sforzo per garantire al pubblico una miglior sicurezza dei prodotti alimentari.

Tabella 2 - **Comparazione tra metodi immunoenzimatici e cromatografici per la determinazione dei residui di Metil-2-Benzimidazolocarbammato nei succhi e nei concentrati di frutta**

Campione	ppb di MBC rilevate	
	Metodi immunoenzimatici	Cromatografia liquida
Apple Conc.	365	367
White Grape Conc.	<10	<10
Apple Conc.	81	96
Apple Conc.	194	200
Apple Conc.	<10	<10
Apple Conc.	42	35
Grape Conc.	<10	<10
Grape Conc.	31	<10
Orange Conc.	25	<10
Pineapple Conc.	<10	<10
Berry Conc.	33	<10
Cran-Raspberry Conc.	<10	<10
Citrus Conc.	36	<10
Apple Juice	52	56
Apple Raspberry Juice	33	42
Apple Cherry Juice	63	58
Apple Juice	26	35
Apple Cherry Juice	18	15
Apple Juice	<10	<10
Apple Apricot Juice	<10	<10
Apple Cherry Juice	<10	<10
Apple Cherry Juice	<10	<10
Apple Juice	<10	<10
Apple Juice	<10	<10
Apple Cherry Juice	260	236
Apple Raspberry Juice	130	100

Da: B.C. Fergusson et al. "Rapid Enzyme Immunoassays for Pesticides in Food, Water or Soil at Parts per Billion Concentrations" Sept. 1988. AOAC Poster, West Palm Beach (Florida).

Figura 5



Per la determinazione degli antibiotici, vale la pena menzionare la recentissima disponibilità di test per determinare la presenza semiquantitativa di pesticidi, antibiotici e micotossine in acqua, urina e tessuti animali o vegetali, latte, ecc., da eseguirsi in circa 10 minuti, senza necessità di strumentazione o di particolare addestramento. Il formato di *kit* è commercialmente designato: *La Carte Test*. La facilità di esecuzione di questo test è paragonabile ai test per gravidanza disponibili in farmacia e di uso oramai comunissimo. Il *kit* di dosaggio è rappresentato da una piccola confezione completa di tutti i reagenti ed accessori. La carta su cui si esegue la misura ha le dimensioni di una comune carta di credito, con l'anticorpo specifico immobilizzato su un filtro in essa inserito. Sono presenti due pozzetti: uno per il controllo ed uno per il campione. L'esecuzione si effettua in 8-10 minuti ed il risultato è interpretato in base al colore che appare nei pozzetti (vedi fig. 5 per un test di cloramfenicolo). Tenendo conto che si tratta di un test a competizione, il controllo negativo (a sinistra in fig. 5) sviluppa sempre un colore blu-porpora, mentre il pozzetto campione (a destra in fig. 5) sviluppa lo stesso colore se la concentrazione dell'analita è al di sotto di un determinato valore soglia (che varia a seconda del test e del materiale biologico analizzato) oppure non sviluppa colore se la concentrazione della sostanza è al di sopra del valore soglia (la figura 5 è quindi un esempio di test positivo per l'antibiotico cloramfenicolo).

La *Carte Test* è un test immunoenzimatico qualitativo per la determinazione nell'urina, nel siero, nel latte, nei mangimi, ecc., di micotossine, di pesticidi e di antibiotici (quali: sulfametazina, sulfadimetossina, tilosina, cloramfenicolo, ecc.). Nel caso di sulfametazina e cloramfenicolo, questa procedura di *screening* serve come indicatore della presenza di residui di antibiotico che siano in violazione dei livelli di tolleranza pari a zero, imposti dall'OMS o dalla legislazione italiana, cioè la completa assenza di residui in carne, uova e latte.

E' utile descrivere in maggior dettaglio *La Carte Test* per due antibiotici di un certo interesse: sulfametazina e cloramfenicolo.

I sulfonamidi sono una classe di farmaci antimicrobici largamente usati negli animali e nell'uomo. La sulfametazina, appartenente a questa classe di composti, viene usata come agente profilattico e terapeutico in: suini, bovini, cavalli, pecore, polli, tacchini, cani e gatti. Quest'antibiotico è normalmente somministrato sotto forma di additivo alimentare oppure nell'acqua da bere ed è riconosciuto per la sua efficacia nel trattamento e prevenzione della rinite atrofica nel maiale. E' stato dimostrato che gli animali trattati con sulfametazina sono in grado di sequestrare livelli significativi di sulfametazina nei loro tessuti durante il trattamento. Dato che l'ingestione di sulfametazina a certi livelli può causare dei problemi di natura tossicologica all'uomo, la carne destinata al consumo alimentare non dovrebbe contenere , secondo l'OMS, alcun livello di residui di sulfametazina al momento in cui l'animale è destinato alla macellazione. In USA, per assicurarsi dell'assenza di livelli potenzialmente pericolosi di sulfametazina nella carne, la FDA richiede che in tutti gli animali sia interrotto il trattamento con sulfametazina almeno 15 giorni prima della macellazione. Durante questo periodo di sospensione, i residui di sulfametazina scompaiono gradualmente dai tessuti e sono eliminati come l'urina.

I livelli di tolleranza negli Stati Uniti per carni animali commestibili prima di cottura sono stati fissati in 0,1 parti per millione (ppm) per bovini, suini e polli negli Stati Uniti. In Italia, l'OMS impone livelli di tolleranza pari a zero, cioé la completa assenza di residui in carne, uova e latte. Per evitare di condurre a macellazione animali in violazione dei limiti legali, una misura dei livelli di residui di sulfametazina dovrebbe essere eseguita dal veterinario o perfino dall'allevatore stesso.

Il cloramfenicolo (CAF) è un batteriostatico ad ampio spettro d'azione, è attivo contro una serie batteri di Gram-negativi e Gram-positivi, mentre è pressoché inefficace su spirochete e protozoi e del tutto inattivo su micobatteri e pseudomonas. L'uso, prevalentemente veterinario data la sua tossicità per l'uomo, è terapeutico e riguarda il trattamento di infezioni dell'apparato urinario, particolarmente di certi casi acuti di salmonellosi, di febbri tifoidi e di meningiti batteriche. Il cloramfenicolo può essere inoltre impiegato contro infezioni causate da stafilococchi-coliformi resistenti ad altri antibiotici. Il CAF non è ammesso come integratore medicato, cioè non è addizionato ai mangimi, ma è somministrato oralmente come CAF-palmitato, per via i.v., i.m. oppure s.c. come CAF sodio-succinato, topicamente all'1% per via sottocongiuntivale o per applicazione endouterina in caso di metriti. Le dosi generalmente usate per il trattamento variano a seconda della specie animale. Il meccanismo d'azione si basa sul fatto che il CAF si lega reversibilmente alla subunità ribosomiale 50S ed agisce inibendo l'allungamento della catena peptidica in via di formazione. Il CAF è altamente tossico per l'uomo, in cui inibisce la sintesi delle proteine mitocondriali, particolarmente nelle cellule eritropoietiche del midollo osseo (con conseguente anemia aplastica). La ricerca tradizionale dei residui nella carne, nei parenchimi, nel latte e nelle uova si esegue ricorrendo a metodi fisico-chimici (HPLC, polarografia, gas-cromatografia, TLC ecc.) ed a metodi microbiologici. I livelli accettabili di residui di antibiotici in alimenti di origine animale

stabiliti dalla FAO/WHO per il Cloramfenicolo sono zero in carne, latte e uova. Tuttavia, in un recente lavoro di De Giovanni e collaboratori dell'Università di Napoli, sulla ricerca per HPLC di cloramfenicolo in uova vendute sfuse o in confezione, la presenza dell'antibiotico è stata notata con una frequenza tale da richiamare l'attenzione del sistema di controllo pubblico.

Grazie allo sviluppo di test di *screening* rapidi e semplici, è adesso possibile monitorare i livelli di sulfametazina prima della macellazione. I primi test sviluppati per monitorare i residui di antibiotici negli animali sono: il *Live Animal Swab Test* (LIVE), il *Swab Test on Premises* (STOP) ed il *Calf Antibiotic Swab Test* (CAST). Tutti questi test analizzano l'urina dell'animale come campione biologico e determinano la presenza di una vasta gamma di agenti antimicrobici attraverso l'inibizione della crescita batterica. Di conseguenza, hanno un'applicazione molto limitata nella determinazione di residui di sulfonamidi.

Un test di *screening* per la sulfametazina chiamato *Sulfa-On-Site* (SOS) è stato sviluppato dall'*US Department of Agriculture- Food Safety Inspection Service.* Si tratta di un saggio semi-quantitativo, basato sulla cromatografia su strato sottile, che utilizza come campioni per analisi: urina, siero , acqua ed estratti metanolici di mangimi. Il test SOS richiede una notevole esperienza di laboratorio, l'impiego di solventi organici tossici e volatili, e fornisce un risultato in circa 30-40 minuti.

La Carte Test per sulfametazina o per cloramfenicolo è un saggio immunoenzimatico competitivo che viene eseguito in maniera sequenziale. L'antibiotico è estratto con una miscela di metanolo/acqua dal campione di mangime, chiarificato per filtrazione e diluito con il tampone fornito nel *kit*, oppure è dosato nel campione di urina o di siero diluiti con il tampone fornito nel *kit*. L'estrazione della sulfametazina da un campione di latte viene effettuato previa leggera acidificazione, centrifugazione e neutralizzazione del campione prima del dosaggio. Il campione diluito ed il controllo negativo sono distribuiti nei corrispondenti pozzetti sulla carta. Dopo l'assorbimento di questi ultimi, l'enzima coniugato è aggiunto ai pozzetti, seguito da un reagente di lavaggio e dal reagente substrato. Si può interpretare il risultato del test dopo soli cinque minuti dall'aggiunta del substrato. In questo formato di saggio competitivo, l'analita presente nel campione compete con l'analita coniugato all'enzima per legarsi all'anticorpo immobilizzato sulla carta. La presenza di un livello significativo di antibiotico è indicato dall'assenza di colore nel pozzetto campione.

Nel caso del test per **sulfametazina**, lo schema di interpretazione dei risultati è il seguente:

A. URINA

Un risultato NEGATIVO indica che l'urina analizzata contiene sulfametazina ad un livello inferiore a 0,5 ppm.

Un risultato POSITIVO indica che l'urina analizzata contiene sulfametazina ad un livello uguale o superiore a 0,5 ppm. Campioni contenenti sulfametazina a livelli inferiori a 0,5 ppm ma maggiori di 0,25 ppm possono dare un risultato positivo. La frequenza di risultati positivi in questo ambito diminuisce al diminuire del livello di sulfametazina da 0,5 ppm a 0,25 ppm.

B. SIERO

Un risultato NEGATIVO indica che il siero analizzato contiene sulfametazina ad un livello inferiore a 0,16 ppm.
Un risultato POSITIVO indica che il campione analizzato contiene sulfametazina ad un livello equivalente o maggiore di 0,16 ppm.
Campioni che contengono sulfametazina a livelli inferiori a 0,16 ppm ma superiori a 0,08 ppm possono dare un risultato positivo. La frequenza di risultati positivi in questo ambito diminuisce al decrescere del livello di sulfametazina da 0,16 a 0,08 ppm.

C. MANGIME

Un risultato NEGATIVO indica che il campione analizzato contiene sulfametazina ad un livello inferiore a 1,2 ppm.
Un risultato POSITIVO indica che il campione analizzato contiene sulfametazina ad un livello equivalente o maggiore di 1,2 ppm.
Campioni che contengono sulfametazina a livelli inferiori a 1,2 ppm ma superiori a 0,6 ppm possono dare un risultato positivo. La frequenza di risultati positivi in questo ambito diminuisce al decrescere del livello di sulfametazina da 1,2 a 0,6 ppm.

Nel caso della determinazione del cloramfenicolo con *La Carte Test*, le prestazioni del metodo sono state studiate da un gruppo di ricercatori olandesi in paragone a tecniche cromatografiche standard sia in carcasse di animali macellati sia in uova. La conclusione è che il CAF si può determinare nelle uova a livelli di 2 ppb ed oltre sia con *La Carte Test* sia con la HPLC (J.F.M. Nouws *et al.*, Archiv für Lebensmittelhygiene, *38*, 1-32, 1987) con una semplice procedura di estrazione. Nel caso di animali macellati, nessuna estrazione è necessaria ed un risultato negativo con *La Carte Test* indica valori di CAF inferiori a 1 o 10 ppb ("Monitoring Slaughtered Animals for Chloramphenicol Residues by an Immunoassay Test Kit" (Quik-card), J.F.M. Nouws et al., Archiv fur Lebensmittelhygiene 38, 1, 1987).

Prospettive

Quale il futuro dei test EIA per analisi agro-alimentari? Molto difficile da stabilire. Senza dubbio rappresentano applicazioni interessanti. Il successo di questi sistemi dipenderà tuttavia da alcuni fattori importanti: le prestazioni che dimostreranno sul campo, l'accettazione da parte di utilizzatori ed organi di controllo ufficiali, la vastità della gamma di test che potranno essere approntati in tempi relativamente brevi.

In ogni caso, la diagnostica agro-alimentare-ambientale sta acquistando una dignità sua propria, al pari di quella umana e veterinaria. Anche questo è un risultato pratico e tangibile della biotecnologia, che va senz'altro in direzione del miglioramento della nostra qualità di vita.

BIBLIOGRAFIA CONSULTATA

- B.A. MORRIS, M.N. CLIFFORD (eds.)(1985): Immunoassays in Food Analysis, Elsevier Applied Science Publishers Ltd.
- E. KURSTAK(1986) Enzyme Immunodiagnosis, Academic Press.
- P. TIJSSEN (1985) Practice and Theory of Enzyme Immunoassays, Elsevier Science Publisher.
- J.C. ALLEN, C.J. SMITH (1987) Enzyme-Linked Immunoassays Kits for Routine Food Analysis, Trends in Biotechnology, *5* (7) 193.
- R.K. LANKOW et al.(1987) Imunoassays for Crop Management Systems and Agricultural Chemistry. In "Biotechnology in Agricultural Chemistry", American Chemical Society, 228.
- A. KLAUSNER (1987) Immunoassays Flourish in New Markets, Biotechnology *5* (6) 551.
- C.H.S. HITCHCOCK (1987) Immunoassay Techniques for Food Analysis, Analytical Proceedings *24*, 146.
- J. MATTINGLY *et al.* (1985) Use of monoclonal antibodies for the detection of *Salmonella* in foods, Food Tecnology *39*, 90.
- R.S. FLOWERS *et al.* (1986) Enzyme immunoassay for detection of *Salmonella* in foods: collaborative study, J.of Ass. of Official Analytical Chemists (USA) *69* (5), 786.
- K.F. ECKNER *et al.* (1987) Comparison of *Salmonella* BioEnzaBead Immunoassay Method and Conventional Culture Procedure for Detection of *Salmonella* in Foods, J. Food Protection *50*, 379.
- D.H. WATSON (ed.) (1987) Natural Toxicants in Food: Progress and Prospects, Ellis Horwood Ltd., Chichester (U.K.).
- S. EWALD (1988) Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of staphylococcal enterotoxin in foods, Int. J. Food Microbiology *6*, 141.
- P. KROGH (ed.)(1987) Mycotoxins in Food, Academic Press.
- D.E. DIXON-HOLLAND *et al.* (1988) Production of Sensitive Monoclonal Antibodies to Aflatoxin B1 and Aflatoxin M1 and Their Application to ELISA of Naturally Contaminated Foods, J. Food Protection *51* (3), 201.
- (1987) Regulating Pesticides in Food: the Delaney Paradox, National Academy Press, Washington, D.C..
- Pesticide Residues in Food: Technologies for Detection, Congress of the United States, Office of Technology Assessment, October 1988.
- J.F.M. NOUWS *et al.* (1987) Monitoring Slaughtered Animals for Chloramphenicol Residues by an Immunoassay Test Kit (Quik-card), Archiv für Lebensmittelhygiene *38*, 1.

Fedrigo M.
Istituto Clinica Chirurgica - Facoltà di Medicina Veterinaria
Università di Bologna

Proposte applicative dell'ecografia nei piccoli animali

Scopo principale del nostro incontro è quello di fornire alcune nozioni basilari sufficienti non solo a far conoscere la diagnostica ecografica, ma anche ad informare i Colleghi circa le reali capacità applicative di questo procedimento diagnostico. Trattasi di un esame collaterale alla visita clinica propriamente detta che, attraverso l'interazione degli ultrasuoni con i tessuti, ci offre la possibilità di distinguere strutture solide da strutture liquide, ivi comprese tutte le variazioni intermedie. Il fascio ultrasonoro generato dalla sonda o trasduttore, posto a contatto diretto con il comune tegumento, attraversa tessuti ed organi incontrati sul suo cammino ad una profondità direttamente proporzionale alla sua potenza, ma inversamente proporzionale alla capacità di assorbimento delle singole strutture.

Ogni strato colpito diminuisce la forza degli ultrasuoni in quanto parte di essi viene riflessa verso il trasduttore come echi e parte attraversa, ove possibile, il bersaglio per colpirne uno successivo ripetendo ancora il fenomeno fino ad esaurimento della potenza. Gli echi che ritornano alla sonda vengono elaborati e tradotti in immagini sullo schermo del monitor sotto forma di Ampiezza (*A-mode*) o di Brillantezza (*B-mode*); il primo sistema mostra, in pratica, un grafico, il secondo la forma e lo stato fisico. In ultrasuonodiagnostica viene comunemente usato il *B-mode*. Il termine corretto e completo sarebbe **Ecotomoscopia**, cioé visualizzazione di echi provenienti dallo stesso piano di taglio. È fondamentale infatti ricordare sempre che l'immagine osservata sul monitor si riferisce a quelle strutture che in quel momento si trovano sullo stesso piano, a differenza dell'immagine radiologica che riporta invece il risultato di sommazione di immagini. Diversamente dai Raggi X, l'ecografia non indaga il tessuto osseo in quanto gli ultrasuoni vengono completamente riflessi dai tessuti duri o strutture fisicamente analoghe (calcoli) per cui, distalmente a questi, si osserva il silenzio acustico evidenziato come cono d'ombra. Anche i gas bloccano gli ultrasuoni riflettendoli totalmente.

La diagnosi si formula nel momento in cui si effettua l'esame, perciò l'ecografia deve essere praticata dal medico stesso, il quale non può emettere un giudizio diagnostico sulle immagini statiche fissate da una fotografia. Anche in questo particolare notiamo la differenza con la radiografia che può essere eseguita da un tecnico e successivamente interpretata da un radiologo. Le fotografie che si eseguono durante l'esame ecografico servono soltanto a fissare i quadri più significativi dell'indagine, ma il loro valore è completo soltanto se inserito nel contesto dinamico di tutta l'esplorazione ecografica.

Gli ultrasuoni, attraverso tessuti ed organi, generano una serie di echi che formano le immagini ecografiche delle rispettive strutture colpite; avremo immagini iperecogene (più luminose), ipoecogene (comparativamente meno lumi-

nose), anaecogene od ecoprive; chiamiamo *interfacies* il limite di passaggio tra due strutture ad ecogenicità diversa; definiamo **rinforzo di parete posteriore** il fenomeno che rende iperecogena la parete o interfaccia distale di una struttura a contenuto liquido (vescica, cisti, ecc.).

Non essendo questa la sede idonea ad ulteriori approfondimenti, limitiamo la parte introduttiva alle nozioni basilari esposte ricordando che è sempre necessario, da parte dell'ecografista, conoscere perfettamente le capacità tecniche del proprio ecografo al fine di sfruttare al massimo le risorse che possiede e di non cercare ciò che non si può ottenere. La perfetta taratura e il corretto trattamento del segnale possono fornire informazioni diagnostiche sostanziali che potrebbero sfuggire a causa di minime variazioni tecniche non apportate al complesso settore di ricezione degli echi.

Le nostre esperienze nel settore diagnostico sui piccoli animali hanno toccato tutti gli apparati riconoscendo la validità dell'indagine non solo come mezzo diagnostico propriamente inteso, ma anche come utile ausilio all'attuazione pratica di *follow-up* efficaci. Si deve ricordare che l'ecografia è assolutamente innocua sia per il medico sia per il paziente e, non essendo invasiva, può essere praticata in qualsiasi condizione il paziente si trovi; l'unico problema è costituito dal pelo, che va tassativamente tagliato, e dai gas intestinali che debbono essere rimossi farmacologicamente.

Dall'esame dei segnali che si ottengono dall'apparecchio nasce la **semeiotica ecografica** che ci consente di interpretarli. Riassumendo i concetti semiologici fondamentali, possiamo schematizzare i reperti nel modo seguente:

1) struttura solida omogenea
2) struttura solida disomogenea
3) struttura semisolida (o semiliquida)
4) raccolta liquida omogenea
5) raccolta liquida disomogenea

In pratica ogni bersaglio transonico può essere inquadrato in questo schema che non deve essere applicato rigidamente, poiché in biologia non c'è nulla di assoluto, ma deve essere interpretato.

Diamo alcuni esempi:

1) **Struttura solida omogenea** - Il parenchima epatico, nel cui contesto si possono evidenziare strisce prive di echi riferibili alla distribuzione vascolare. Analogamente dicasi per la milza, più ecogena del fegato, nel cui parenchima si reperiscono agevolmente i vasi splenici dall'ilo fino alle più fini diramazioni. Strutture solide omegenee possono essere anche patologiche come i fibromi e i lipomi comunemente iperecogeni, uniformi, ben delimitati.

2) **Struttura solida disomogenea** - In questo gruppo vanno inserite quelle strutture che offrono risposte ecografiche di diversa intensità, accompagnate dalla disarmonia della struttura sia nel suo interno sia nei contorni irregolari e mal definibili. Di solito si tratta di neoplasie.

3) **Struttura semisolida-semiliquida** - Vengono definiti così tessuti ed organi ad ecogenicità varia, che alternano zone ecogene ad altre ecoprive. Di solito si tratta di strutture patologiche anche se alcuni organi come il rene presentano fisiologicamente diversi gradi di risposta ecogena a seconda che si tratti della corticale, della midollare (ipoecogena) e del bacinetto (anecogeno). In questo

caso però la perfetta e ordinata distribuzione delle varie parti, supportata dalle conoscenze dell'anatomia, non può trarre in inganno.

4) **Raccolta liquida omogenea** - Esempio tipico è quello della vescica o della cistifellea oppure quello offerto dalle cisti sierose; in altre parole si definiscono tali quelle strutture fisiologiche o patologiche il cui contenuto sia esclusivamente liquido privo di echi.

5) **Raccolta liquida disomogenea** - Valgono gli stessi esempi di prima, ma il contenuto sarà patologico per la presenza di sangue, pus, fibrina o concrezioni inorganiche che si traducono in echi di varia dimensione e intensità.

Esistono infine dei quadri ecografici particolari che possiamo chiamare misti, in quanto non perfettamente inquadrabili in una delle categorie citate; è il caso della raccolta liquida peritoneale, l'idrope-ascite.

È un quadro ecograficamente complesso in cui si devono studiare sia le caratteristiche del liquido raccolto sia lo stato degli organi endo-peritoneali. L'ecografia in questi casi è di facile esecuzione in quanto gli ultrasuoni si diffondono perfettamente nel mezzo liquido senza subire dispersioni o distorsioni, perciò le strutture a contatto del versamento si presentano molto nitide e ben definite nei contorni essendo il liquido totalmente privo di echi.

Il **fegato** è un organo ben investigabile con l'ecografia: se ne studiano i contorni e la struttura del parenchima, la cui ecogenicità varia in caso di steatosi, cirrosi, metastasi oppure anche in caso di epatiti di modesta entità. Nel parenchima epatico appaiono prive di echi le vene sovraepatiche che convergono nella vena cava e si distinguono da quelle del sistema portale, sempre provviste di echi parietali. La rete vascolare appare particolarmente dilatata nel fegato da stasi. Per il contenuto liquido è priva di echi anche la cistifellea, se fisiologica, di cui esaminiamo la forma, le pareti e lo stato fisico della bile.

La **milza**, più ecogena del fegato, viene esplorata quasi sempre unitamente a questo. Frequenti le splenomegalie, gli ematomi, le rotture e le neoplasie.

I **reni**, sui quali già abbiamo detto circa le differenti risposte ecografiche relative alla corticale, midollare e bacinetto, sono spesso esplorati per lesioni regressive, per idronefrosi e cisti, per calcolosi o renella, per neoplasie.

La **vescica** in replezione fisiologica o artificiale offre risposte ecografiche piuttosto chiare nei frequenti casi di cistite, ematuria, neoplasie, calcolosi. Circa queste ultime possiamo affermare che l'ecografia è più precisa della radiografia in quanto concrementi molto piccoli (1-2 mm) o la cosiddetta renella non vengono documentati con i Raggi X, mentre sono evidentissimi agli ultrasuoni.

La **prostata** viene ispezionata con molta attendibilità e nelle numerosissime diagnosi, spesso generiche, di ipertrofia, la diagnosi ecografica può puntualizzare se trattasi realmente di ipertrofia semplice oppure cistica di ascesso o di adenocarcinoma.

L'**utero** in condizioni fisiologiche è difficilmente identificabile, così come l'ovaio, ma, se patologico, diventa visibile agli ultrasuoni, per cui si diagnosticano con precisione le endometriti, le raccolte liquide, i tumori benigni e maligni. Tralasciamo la diagnosi di gravidanza, ormai da tutti riconosciuta in tutte le specie animali. Diremo soltanto che l'ecografia in gravidanza non solo conferma la presenza dell'embrione prima, del feto poi, ma ci fornisce indicazioni su eventuali malformazioni e sulla vitalità del prodotto.

Ancora per quando riguarda la cavità addominale, siamo spesso chiamati ad ecografare **stomaco** e **intestino** per osservare lo stato della mucosa e delle pareti (flogosi - neoformazioni), il contenuto (c.e. radiotrasparenti), paratopie (volvoli - invaginamenti).

Il **pancreas**, così come nell'umana specie, è di difficile reperimento, ciononostante abbiamo avuto l'opportunità di esaminare lesioni infiammatorie e neoplastiche.

Per quanto riguarda la cavità toracica, l'ecografia è molto utile nello studio della zona di confine toraco-diaframmatica per diagnosticare ernie diaframmatiche, versamenti nei seni costo-diaframmatici e lesioni focalizzate alla base dei polmoni, qualora il parenchima sia privo di aria.

Il **cuore** resta comunque l'unico organo esplorabile completamente con gli ultrasuoni. Abbiamo documentato versamenti pericardici, difetti settali e valvolari, ipertrofie, filariosi, tumori.

È possibile ancora esplorare i **linfonodi**, le **ghiandole salivari**, la **tiroide** di cui abbiamo raccolto molti reperti, ma desidero concludere questa rapidissima rassegna ricordando il valido contributo dell'ecografia nel settore oculistico. L'ecografia dell'**occhio** viene richiesta con una certa frequenza in quanto è l'unico mezzo che consente di esplorare il globo oculare, escludendo la TAC e la RMN, quando la cornea non è trasparente. L'ecoftalmografia ci permette di diagnosticare lo stato dell'umor acqueo, del cristallino, della retina e della papilla quando, ripeto, non è tecnicamente possibile effettuare l'esame oftalmoscopico.

Al termine di questa lunga carrellata ricordo che è in via di evoluzione l'ecografia dell'apparato muscolare e teno-desmico, soprattutto nel cavallo sportivo e che l'evoluzione tecnologica ci riserverà ulteriori gradite sorprese nel settore della diagnostica per immagini di cui l'ecotomografia fa parte.

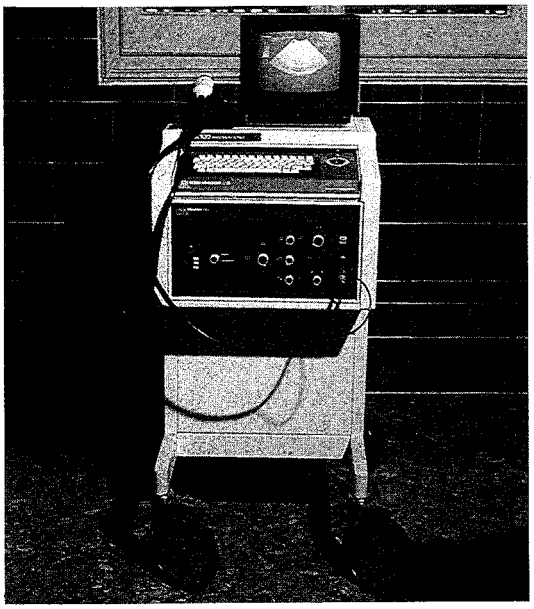


Figura 1 - **Ecotomografo modello ATL 100 con sonda settoriale a multifrequenza (3,5 - 5 - 7 MHz).**

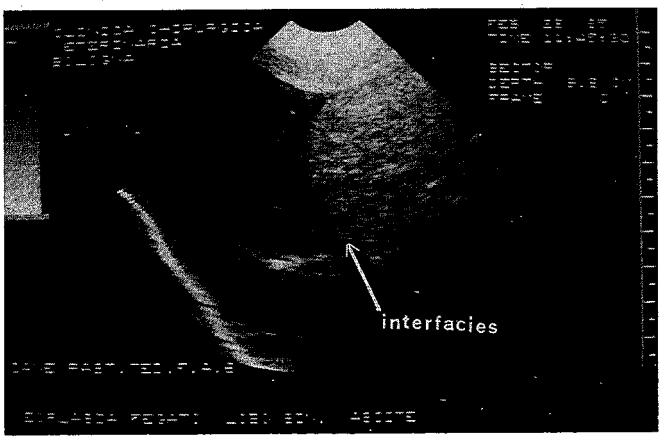


Figura 2 - ***Interfacies*** **intesa come zona di maggior riflessione nel punto di passaggio tra 2 strutture a diversa impedenza acustica. Nel caso specifico, passaggio tra liquido ascitico e parenchima epatico.**

Figura 3 - **Aspetto ecografico di una neoplasia alla milza di un cane. Si presenta come struttura solida disomogenea ad ecogenicità varia. Le zone ipoecogene sono riferibili ad aumentata vascolarizzazione.**

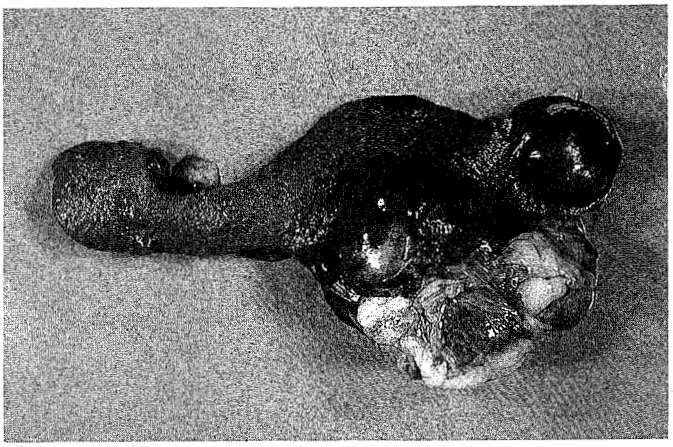


Figura 3 bis - **Aspetto macroscopico**

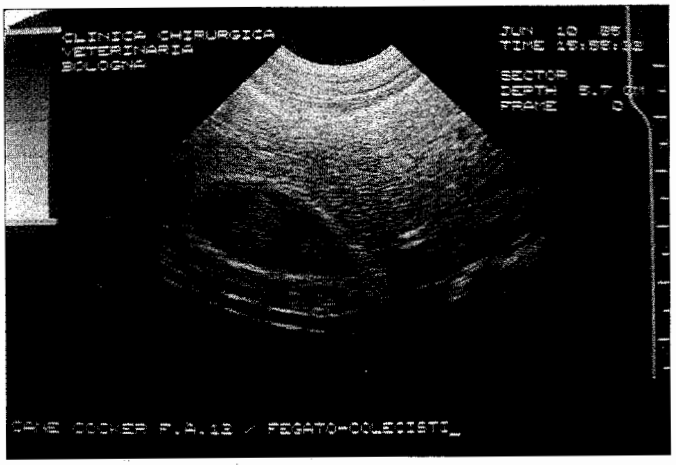


Figura 4 - **La cistifelea appare delimitata da un'*interfacies* che si evidenzia nel parenchima epatico ad ecogenicità uniforme. Nel contesto ecoprivo della colecisti appaiono piccole aree debolmente ecogene come espressione di bile poltacea.**

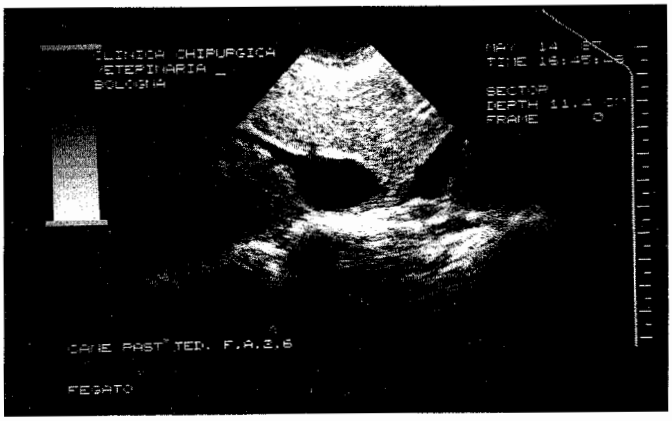


Figura 5 - **Fegato da stasi in un cane. Evidenti le parti prive di echi che si staglia nella struttura ecogena epatica, riferibili alle vv. sovraepatiche ectasiche confluenti nella v. cava.**

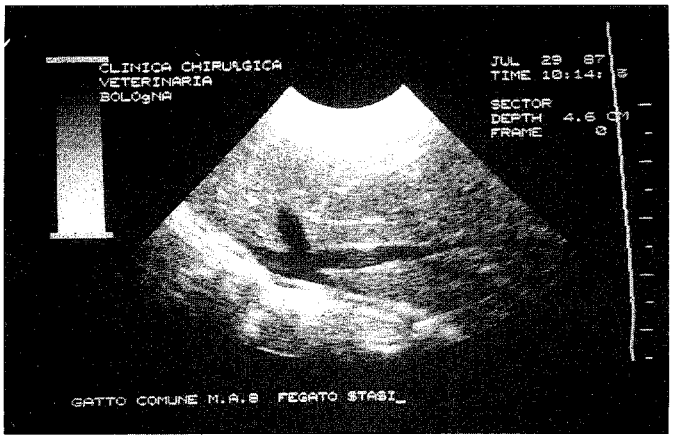


Figura 6 - **Fegato da stasi in un gatto. Le vv. sovraepatiche notevolmente ectasiche confluiscono nella v. cava.**

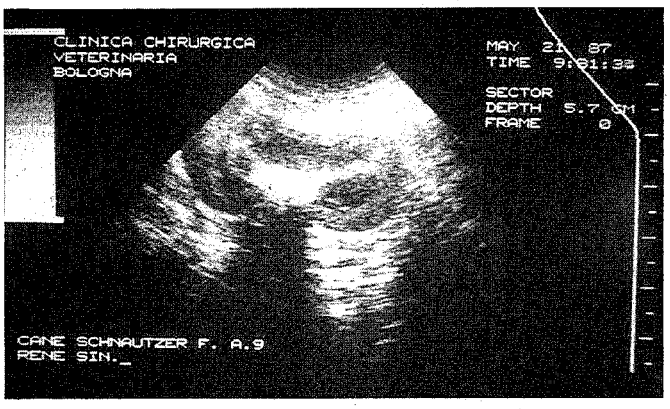


Figura 7 - **Rene di cane in scansione longitudinale. Evidente la differenza ecografica tra la corticale e la midollare. Quest'ultima, ipoecogena, circonda un'area patologica iperecogena nella zona del bacinetto. Trattasi di litiasi in quanto la struttura pielica è seguita da un cono d'ombra.**

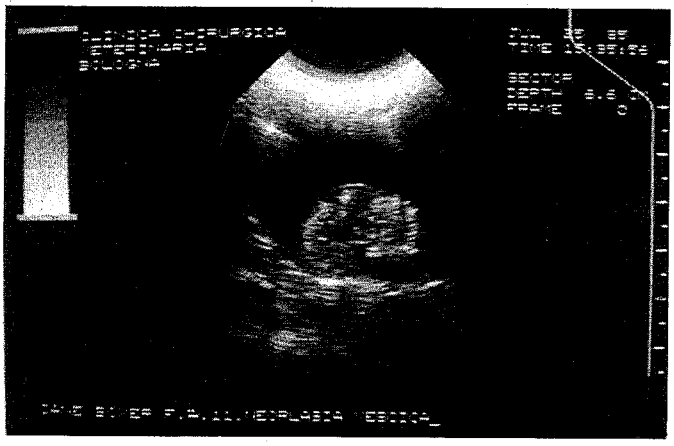
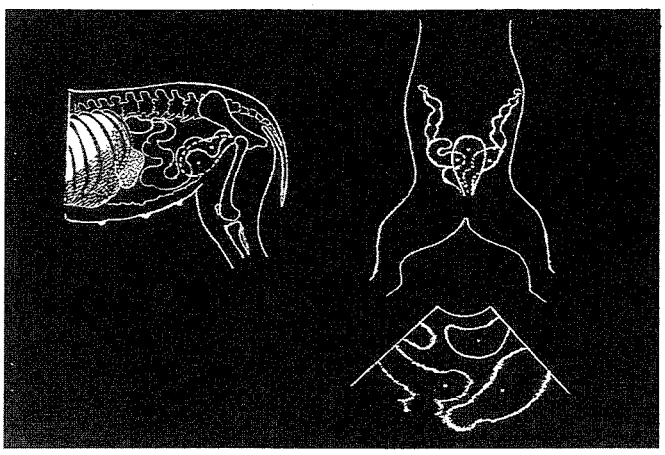


Figura 8 - **Nel contesto privo di echi di una vescica di cane si staglia una massa solida disomogenea con larga base di impianto sulla parete riferibile a neoplasia.**



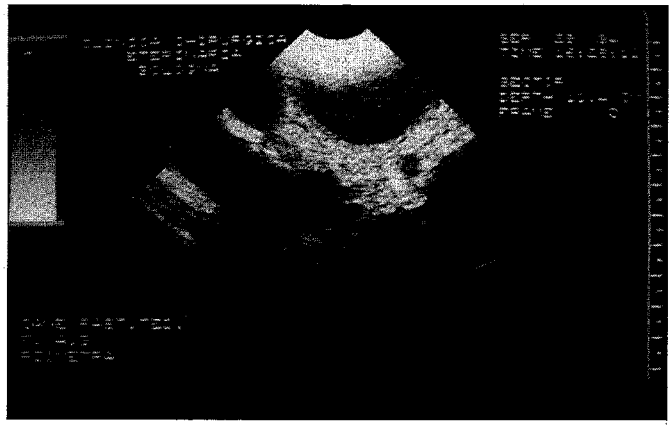


Figura 9 e 9 bis - **Figura semischematica della presunta topografia di un utero con raccolta purulenta; in basso il disegno esplicativo della relativa ecografia in cui si indica con V la vescica e con U le corna uterine. Si evidenzia l'irocisti in replezione fisiologica ben definita dalla parete che delimita un'area pressocché anecoica anche anche se numerosi piccoli echi liberi testimoniano un abbondante sedimento urinario. Attorno le immagini ecoprive dell'utero. Si noti la assenza di echi interni per la grande fluidità della collezione uterina e l'esile spessore della parete dovuto alla sovradistensione.**

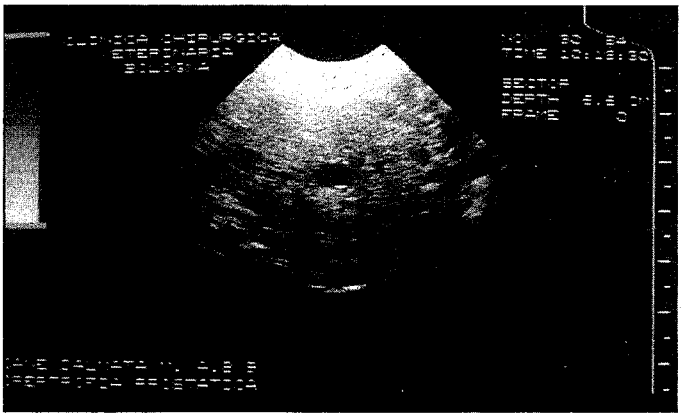


Figura 10 - **Ecografia in scansione trasversale di prostata ipertrofica di cane. In scansione trasversale appare la massa rotondeggiante debolmente ecogena della prostata a echi ordinati e disposti a travature verticali. Al centro è visibile l'area ovalare ecopriva provocata dall'uretra prostatica.**

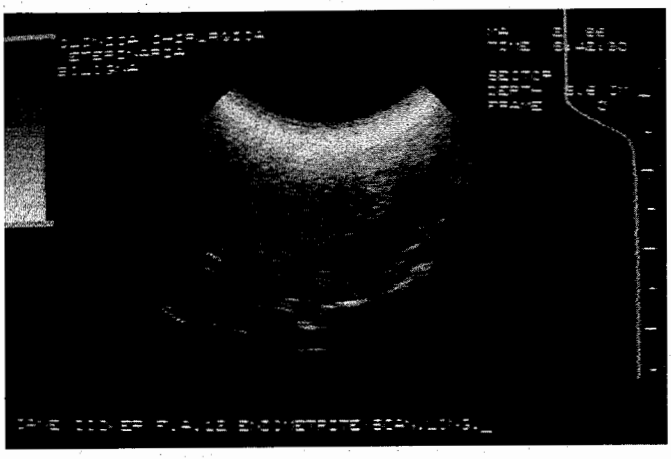


Figura 11 - **Scansione longitudinale di utero di cagna con endometrite purulenta. Evidente l'ipertrofia irregolare dell'endometrio ipoecogeno e festonato che si aggetta nel lume privo di echi.**

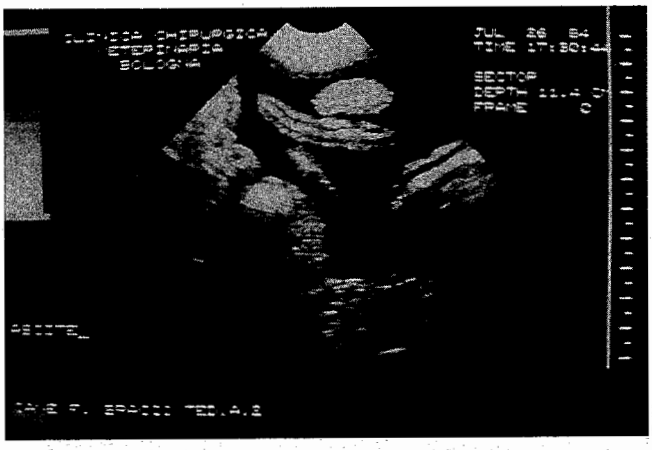


Figura 12 - **Anse intestinali ecografate in un addome ascitico per evidenziare la loro struttura ecografica normale. Si presentano infatti, in scansione longitudinale, con pareti iperecogene a strie ipo-anaecogene delimitanti una parte centrale iperecogena così da conferire l'immagine c. d. a canna di fucile.**

Figura 13 - **Scansione trasversale di anse intestinali in preda a flogosi. L'attenta osservazione delle *interfacies* provocate dalle pareti consente la distinzione dello strato sieroso da quello mucoso, divisi da un sottile intervallo ecoprivo dovuto all'inibizione sierosa provocata dall'edema della parete. All'interno delle anse si manifesta una struttura fortemente ecogena riferibile all'ipertrofia della mucosa intestinale che collabisce.**

Figura 14 - **Ecografia eseguita in scansione trasversale con sonda in posizione retrosternale. Si evidenzia la forma ecogena del del fegato delimitata, distalmente da un'*interfacies* iperecogena interrotta in posizione centrale. Trattasi di rottura del diaframma. Nel punto scontinuato si nota un'eco prodotta dal gas contenuto nella porzione basale del polmone.**

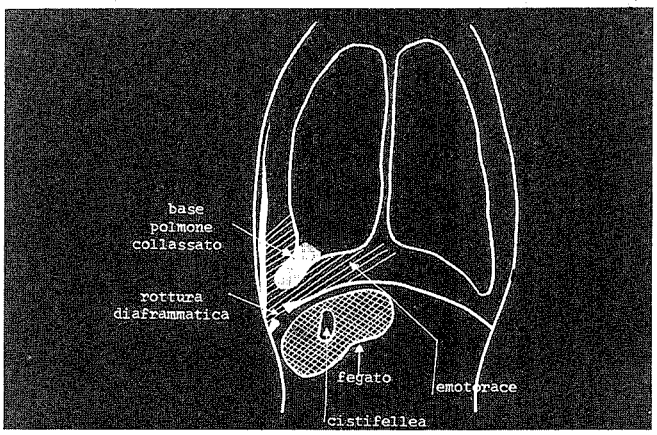
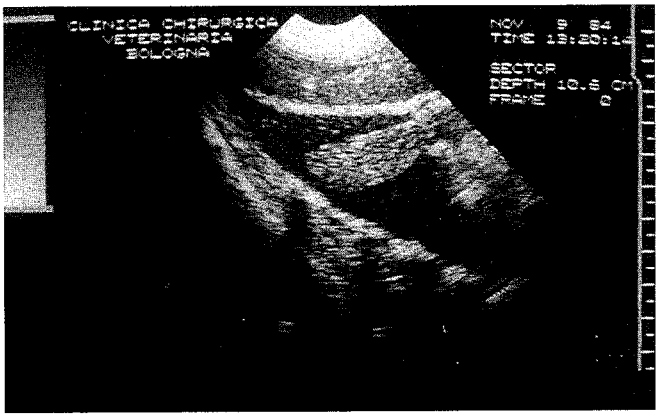
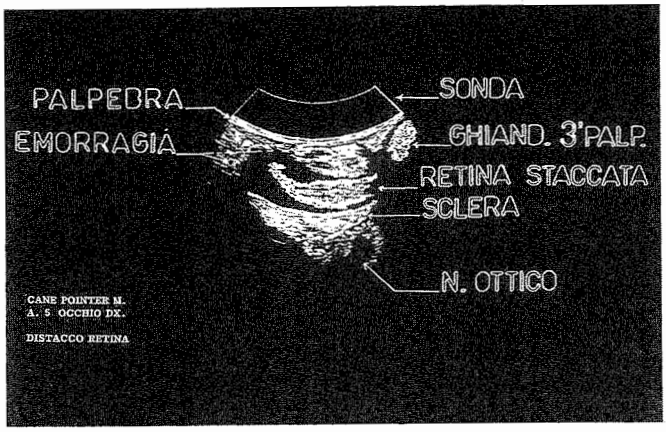


Figura 15 e 15 bis - **Ecografia della regione di confine torco-diaframmatica. Si noti la parte basale del polmone collassata che si presenta ad ecogenicità uniforme tipica dei parenchini, in un contesto ipoecogeno provocato da emotorace. L e zone d'ombra distali sono date dalle coste.**





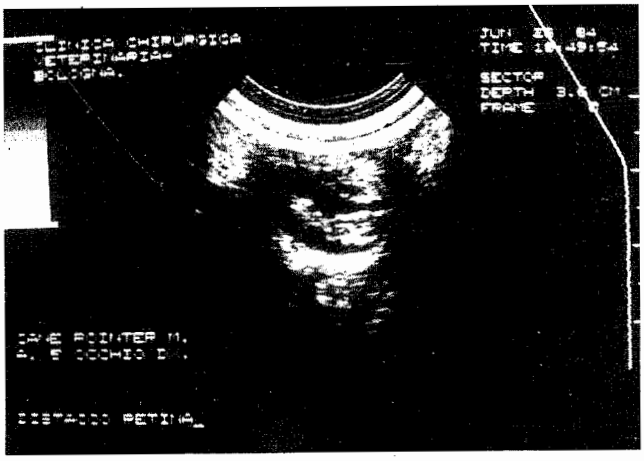


Figura 16 e 16 bis - **Ecoftalmografia. Occhio di cane con ipoema, visibile agli US per la sua ecogenicità, e distacco retinico documentato dalla zona iperecogena sollevata dall'*interfacies* distale in ambito privo di echi dell'umor vitreo.**

N.B. Tutte le ecografie, salvo indicazioni specifiche, sono state effettuate con sonda settoriale.

Ferro E., Brambilla P.G.
Isituto di Patologia Speciale e Clinica Medica - Facoltà di Medicina Veterinaria
Università di Milano

L'esame ecografico del torace del cavallo

Il cuore è l'organo di elezione per l'esame ecografico del torace del cavallo, ma mediante la tecnica *B-mode* è possibile esaminare anche le pleure, in condizioni normali e patologiche.

Il polmone normale non si presta, per la presenza di aria, all'esame mediante ultrasuoni (U.S.), mentre il tessuto polmonare patologico risulta indagabile in tutti i casi in cui vi sia riduzione del contenuto gassoso.

La qualità delle immagini dipende infatti dal grado di attenuazione che subiscono gli ultrasuoni propagandosi attraverso i tessuti: i mezzi gassosi sono cattivi propagatori del suono in quanto attenuano ed assorbono gli U.S.: già ad una profondità di tessuto polmonare pari a 0,05 mm l'intensità ultrasonora risulta dimezzata per frequenze di emissione pari a 2 MHz.

Metodologia

L'esame viene effettuato mantenendo i soggetti in stazione quadrupedale e senza far ricorso a sedazione farmacologica.

Prima di effettuare l'esame, l'area sulla quale viene appoggiata la sonda è detersa con alcool e cosparsa con una generosa quantità di gel.

La sonda da 5 MHz è adatta per l'esame ecocardiografico di soggetti di costituzione normale; essa consente di visualizzare tutte le principali strutture cardiache in corrispondenza delle finestre acustiche sul lato destro del torace (vedi tabella).

Per l'indagine ecocardiografica di soggetti a torace ampio, brachimorfi e/o con abbondante tessuto adiposo sottocutaneo è preferibile l'impiego di una sonda a frequenza più bassa (3,5 MHz); in questi soggetti inoltre, la visualizzazione della valvola mitrale e del ventricolo sinistro è possibile solo attraverso le finestre acustiche di sinistra (vedi tabella).

Per l'esame delle pleure e dei polmoni, da effettuarsi su entrambi i lati del torace (vedi tabella), ben si presta la sonda a frequenza maggiore (5 MHz) che consente la migliore risoluzione delle strutture più superficiali.

Tabella

Organo investigabile	Cuore	Pleure-Polmoni
Lato esplorabile	Destro/Sinistro	Destro/Sinistro
Finestra acustica	IV-V spazio i.c.	VI-VIII spazio i.c.
Frequenza sonda	5-3,5 MHz	5 MHz

Cuore

Quadri ecografici normali

Nella scansione in tecnica *M-mode* (foto 1) si osserva la valvola mitrale normale di cui si possono rilevare, in diastole, i lembi anteriore e posteriore, mentre nel ventricolo destro compare anche il lembo anteriore della valvola tricuspide.

La scansione *B-mode* asse lungo, ottenibile sul lato destro del torace, permette di identificare gli atrii e i ventricoli con le valvole atrioventricolari (foto 2).

Sempre sul lato destro del torace, è possibile ottenere la valvola aortica in asse lungo; nella scansione (foto 3) sono ben visibili le valvole tricuspide ed aortica con il tratto di efflusso del ventricolo sinistro.

Ruotando di 90 gradi circa la sonda sul piano di scansione precedente è possibile esaminare su un solo piano tre valvole: tricuspide, aortica e polmonare, con il tratto di efflusso del ventricolo destro.

Ancora sul lato destro è possibile mettere in evidenza l'immagine dei due ventricoli in asse corto; nella scansione compaiono il ventricolo destro ed il ventricolo sinistro separati dal setto interventricolare, risultano inoltre ben visibili i muscoli papillari (foto 4).

Il lato sinistro del torace è preferibile per ottenere immagini ecografiche della valvola mitrale; nella scansione (foto 5) si rilevano il ventricolo e l'atrio sinistro, separati dalla valvola mitrale.

Quadri ecografici patologici

La bassa frequenza cardiaca, propria di questa specie animale, fa sì che si possa apprezzare il flusso sanguigno sotto forma di nubecole debolmente grigiastre e finemente granulari. L'**ecogenicità del sangue** aumenta ulteriormente qualora subentrino pause nel ritmo cardiaco (**blocchi**), anche a carattere funzionale (foto 6).

Le **discinesie o ipocinesie localizzate del miocardio**, espressione per lo più di disturbi vascolari regionali (**ischemie**) si manifestano come "increspature" dell'endocardio parietale o settale nel tratto compreso tra l'inserzione delle corde tendinee sottovalvolari e l'apice cardiaco.

L'impilamento degli elementi corpuscolati ed i "vortici" impressi sulla massa sanguigna intracavitaria nel caso dei disturbi della motilità (unitamente alla bassa frequenza cardiaca) accentuano il fenomeno della ecogenicità (foto 7).

Un cenno particolare merita il **fascio moderatore,** struttura trabecolare che congiunge il setto con la parete del ventricolo destro e contribuisce ad evitare lo sfiancamento parietale durante la diastole. La sua lunghezza varia considerevolmente in condizioni normali, mentre lo spessore è piuttosto costante e raggiunge al massimo i 5 mm (foto 8).

Sembra che un'ipertrofia di questa struttura sia da interpretare come un meccanismo di compenso del cuore destro nei confronti di eventuali cause che ne determinerebbero un'eccessiva dilatazione, come nel caso delle ipertensioni del piccolo circolo. **Bande moderatrici ipertrofiche** sono state da noi riscontrate in soggetti affetti da enfisema alveolare cronico (foto 9).

Foto 1 - **Scansione M-*mode* della valvola mitrale (normale).**

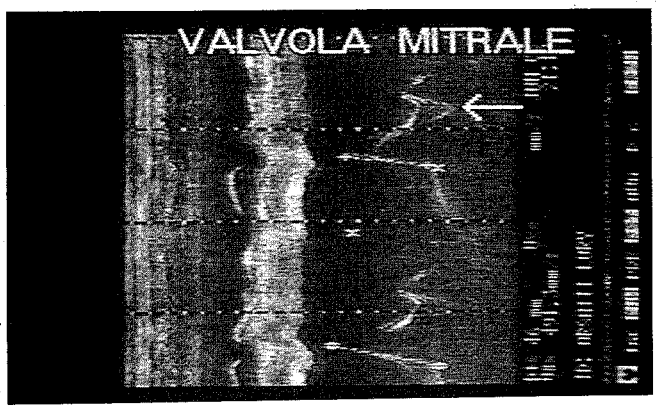


Foto 2 - **Scansione asse lungo.**

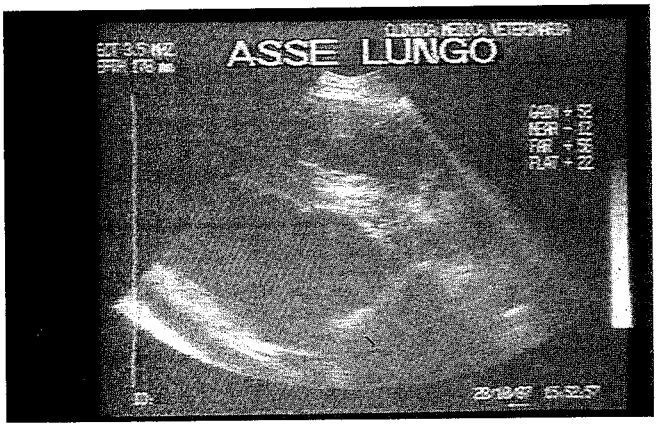


Foto 3 - **Scansione asse lungo a livello della valvola aortica.**

Foto 4 - **Scansione asse corto dei ventricoli destro e sinistro.**

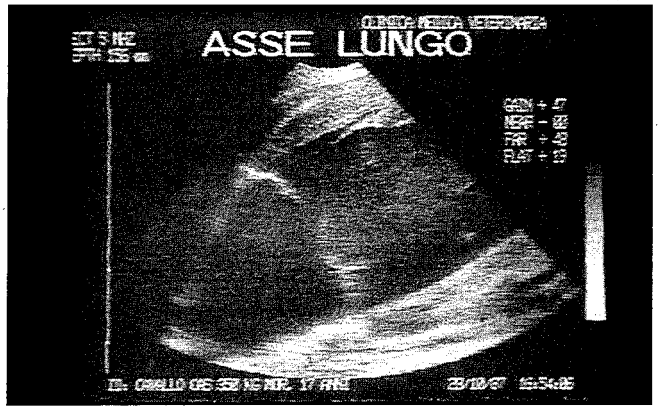


Foto 5 - **Scansione asse lungo dell'atrio e del ventricolo sinistro.**

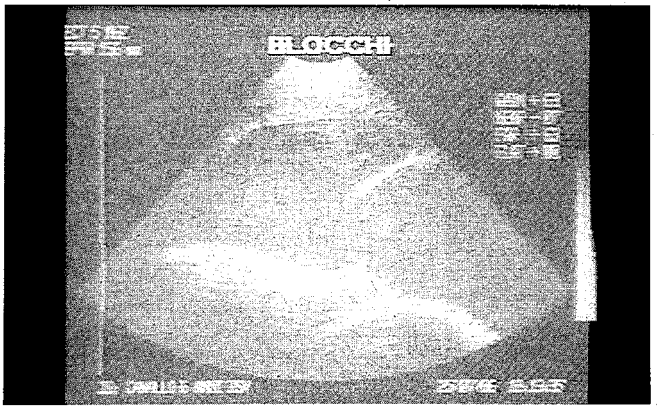


Foto 6 - **Scansione asse lungo.**
Blocchi atrioventricolari: aumento dell'ecogenicità del sangue.

Foto 7 - **Scansione asse lungo. Discinesie miocardiche.**

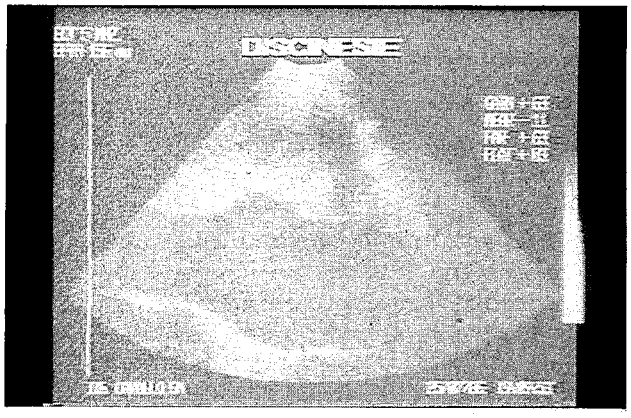


Foto 8 - **Scansione asse corto del ventricolo destro. Banda moderatrice normale.**

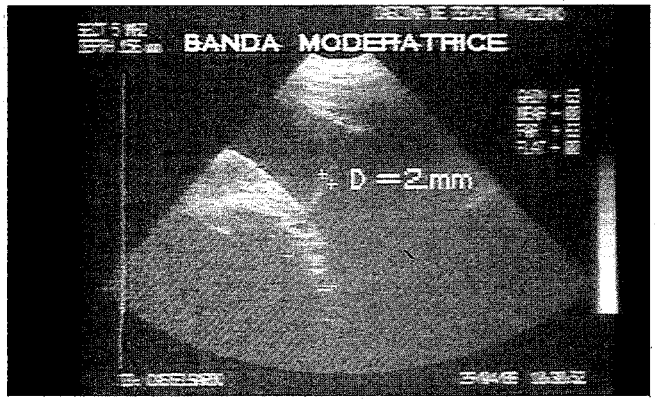
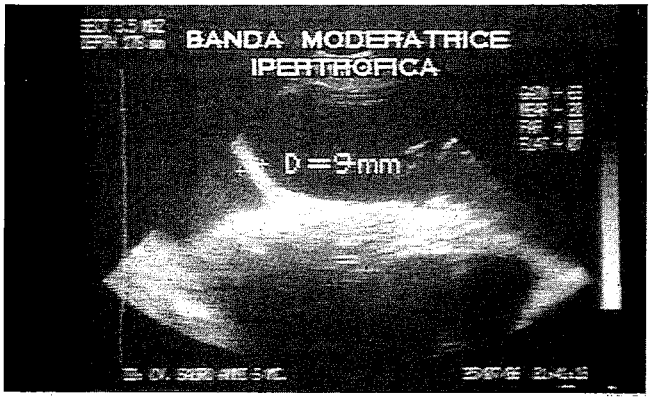


Foto 9 - **Scansione asse lungo del ventricolo destro. Banda moderatrice ipertrofica.**



Per quanto riguarda le **affezioni dell'endocardio**, le tecniche *M-* e *B-mode* consentono l'osservazione di alterazioni morfologiche solamente quando queste risultano di notevole entità (trombosi atriali, endocarditi batteriche con vegetazioni valvolari, rottura o calcificazione delle corde tendinee, ecc.).

La valvola meglio esplorabile in questa specie animale con entrambi i metodi è la mitrale.

Nelle nostre indagini abbiamo avuto occasione di osservare un caso di **fibrosi della valvola mitrale** con insufficienza della stessa. In questi casi il tracciato in *M-mode* permette di rilevare i seguenti segni (foto 10):

- presenza di echi multipli valvolari in sistole (riverberi dovuti all'ispessimento dei lembi);
- elevata pendenza del tratto E-F (per la più rapida chiusura dei lembi valvolari);
- dilatazione atriale sinistra;
- rapida chiusura delle cuspidi aortiche legata alla brusca diminuzione del flusso transaortico e alla riduzione del tempo di riempimento rapido ventricolare.

Solo raramente l'entità della lesione è tale da rendere possibile una diagnosi di insufficienza valvolare; difficile risulta solitamente ottenere un piano di scansione adeguato per mettere in evidenza alterazioni poco appariscenti e/o localizzate in prossimità dell'ostio valvolare.

È inoltre impossibile valutare l'entità del rigurgito transvalvolare. La stima quali-quantitativa delle turbolenze emodinamiche e delle variazioni pressorie endocavitarie si può ottenere, in modo incruento, solamente mediante la tecnica Doppler.

Pleure e polmoni

Quadri ecografici normali

Le pleure normali presentano una superficie uniformemente liscia; tale caratteristica comporta un'elevata riflessione del suono identificabile come artefatto, rappresentato da riverberi concentrici (foto 11). Lo spazio pleurico, quando è visibile, risulta anecogeno per la presenza di liquido pleurico.

Come già detto, il polmone normale non è investigabile per la presenza di aria, scarsamente ecogenica.

Pleure

Quadri ecografici patologici

Le **irregolarità** o **"scabrosità"** delle superfici pleuriche sono identificabili per la presenza di echi raggiati (strie raggiate)(foto 12) e per la conseguente scomparsa di quelli concentrici presenti in una pleura normale .

Tali reperti sono determinati da piccole aree superficiali di addensamento polmonare (epatizzazione, carnificazione) e da irregolarità della pleura viscerale (pleuriti fibrinose). In cavalli asintomatici possono essere interpretati come

Foto 10 - **Scansione M-mode della valvola mitrale.**
Fibrosi e insufficienza della valvola mitrale

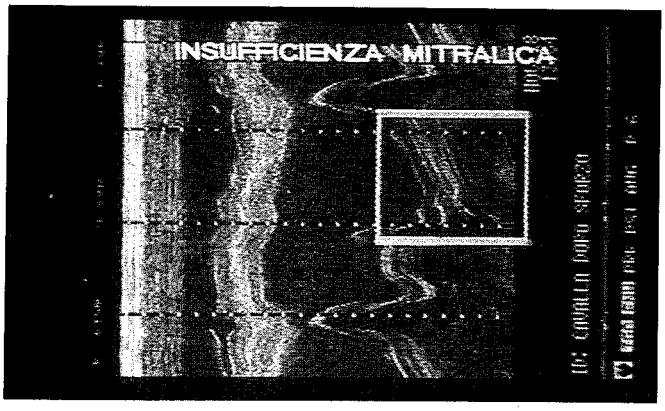


Foto 11 - **Pleure normali**

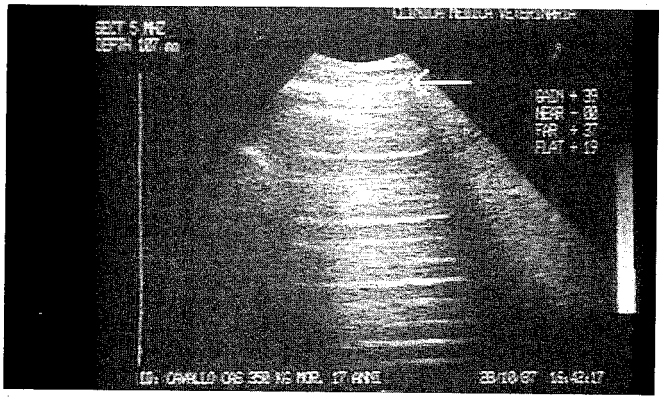


Foto 12 - **Pleurite sierofibrinosa. Irregolarità delle superfici pleuretiche ed aumento dello spazio pleurico.**
Presenza di strutture fortemente ecoriflettenti, riferibili a filamenti di fibrina.

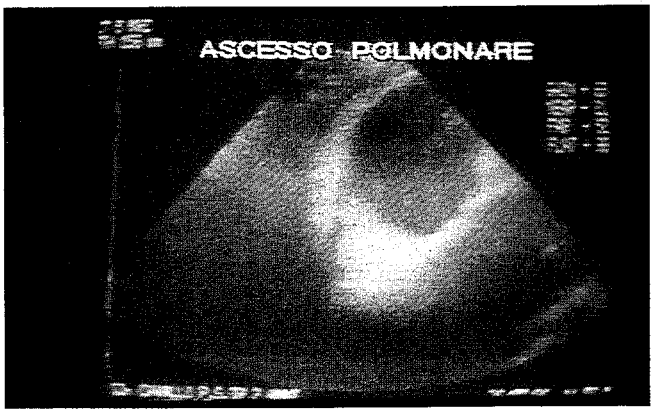


Foto 13 - **Ascesso polmonare. Formazione rotondeggiante ecopriva, delimitata da area ecoriflettente a margini sfumati.**

segno di pregresse pleuropolmoniti.

L'**aumento dello spazio pleurico**, privo di echi, indica la presenza di un **versamento** (idrotorace), mentre il riscontro di una ecogenicità più o meno marcata sta ad indicare che la densità del liquido è aumentata, come avviene nei processi infiammatori acuti e cronici (pleuriti essudative) e nell'emotorace, per la presenza di cellule e fibrina organizzata.

In questi casi, accanto a nubecole grigiastre che variano di intensità nel tempo, si riscontrano formazioni, fortemente ecoriflettenti, riportabili a filamenti di fibrina liberi e adesi alle superfici pleuriche, che presentano movimenti sincroni con le rivoluzioni cardiache. In questi casi coesiste sovente anche una aumentata ecoriflettenza del polmone (vedi oltre) (foto 12).

Polmoni

Quadri ecografici patologici

A causa delle limitate vie di accesso (vedi tabella), l'esplorazione del viscere è ristretta a piccole porzioni del parenchima ed ai suoi margini ventrali. In tutti i casi in cui si ha una diminuzione od assenza di aria negli alveoli, le aree esplorabili acquistano una discreta ecoriflettenza. Ciò si verifica in particolar modo nelle epatizzazioni, carnificazioni ed atelectasie polmonari, talvolta in concomitanza con versamento pleurico (foto 12).

Gli ascessi polmonari sono, sotto il profilo ecografico, difficilmente rilevabili. Tuttavia, qualora essi siano inglobati da tessuto polmonare a ridotto contenuto gassoso, appaiono come formazioni rotondeggianti ed ecoprive, delimitate da zone periferiche a margini sfumati (foto 13).

Conclusioni

Il cuore è l'organo toracico che meglio si presta all'esame ecocardiografico in quanto totalmente esplorabile. Per le pleure gli ultrasuoni risultano un eccellente metodo per mettere in evidenza versamenti, anche di modesta entità. Più limitata è l'applicabilità nell'indagine dei polmoni in quanto è possibile il rilievo delle sole lesioni in cui si riscontra un diminuito contenuto gassoso del viscere.

BIBLIOGRAFIA

1) BONAGURA J.D. (1983): M-mode echocardiography, basic principles. Vet. Clin. North Am. Sm. Anim. Practice, *13*, 299-319.
2) BONAGURA J.D. (1985): Equine heart disease, an overview. Vet. Clin. North Am. Equine Practice, *1*, 2.
3) BONAGURA J.D., HERRING D., WELKER F. (1985): Echocardiography. Vet. Clin. North Am. Equine Practice, *1*, 313-333.
4) BRAMBILLA P.G., FERRO E. (1988): Un cuore senza segreti. Sc. Vet. Biol. Anim., *1*; 15-22.
5) FEDRIGO M. (1985): La diagnosi portata dall'eco. Sc. Vet. Biol. Anim. *6*, 11.
6) FEIGENBAUM H.: (1985): Ecocardiografia, Piccin Ed., Padova.
7) FERRO E., BRAMBILLA P.G. (1987): Problemi di diagnostica cardiologica, Summa, *2*, 151.
8) GOLDBERG S.J., ALLEN H.D., MARX G.R. (1987): Ecocardiografia Doppler. Raffaello Cortina Ed. Milano.
9) KAEMMERER VAN H. (1980): Echokardiographie fuer die veterinaermedizin Der Praktische Tierazt, *3*.
10) KVART C., CARLSTEN J., JEFFCOTT L.B. (1985) Diagnostic valve of contrast echocardiography in the horse. Eq. Vet. J., *17*, 357.
11) LESCURE F., TAMAZLI Y. (1984): Valeurs de reference en echocardiographie T-M chez le cheval de sport. Revue Méd. Vét., 171-176.
12) OMOTO R., KOBAYASHI M. (1983): Ultrasonografia in medicina. Principi e pratica. Verduci Ed. Roma.
13) PELAGALLI G., BOTTE V. (1979): Anatomia veterinaria sistematica e comparata, vol.2, Ermes Ed., Milano.
14) PIPERS F.S., HAMLIN R.L., REEF V. (1979): Echocardiographic detection of cardiovascular lesions in the horse. J. Eq. Med. Surg., *3*, 68.
15) POPP R.L. (1978): Echocardiographic assessment of cardiac disease. Circulation, *54*, 538-552.
16) RANTANEN W.N. (1986): Diagnostic ultrasound. Vet. Clin. Equine Practice. of North Am., W.B. Saunders, *2*, 1.
17) RANTANEN W.N., BYARS T.D., HAUSER M.L. (1984): Spontaneus contrast and mass lesions in the heart of race horse. Ultrasound diagnosis: preliminary data. Eq. Vet. Sci., *4*, 220-223.
18) RANTANEN W.N., EWING R.L. (1981): Principles of ultrasound application in animals. Vet. Radiol. *22*, 196-203.
19) REEF V. (1987): Echocardiographie beim pferd. 1 deutsche Fachtagung ueber Ultraschalldiagnostik in der Veterinaermedizin, Muenchen.
20) REEF V. (1987): Comparision between diagnostic ultrasound and radiography in the assessment of equine lower respiratory tract disease. 1 deutsche Fachtagung ueber Ultraschalldiagnostik in der Veterinaermedizin, Muenchen.
21) VACIRCA G., FERRO E., GOBBO S. (1988): L'indagine ultrasonografica del torace di cavallo. Atti SISVet. (in corso stampa).

Ferro E., Brambilla P.G.
Istituto di Patologia speciale e Clinica medica - Facoltà di Medicina Veterinaria
Università di Milano

Esame ecocardiografico nel cane

L'ecocardiografia è una delle principali metodiche della semeiotica strumentale cardiologica. Essa consente accertamenti diagnostici incruenti, pressoché privi di conseguenze per il paziente.

Il cuore è un organo in costante attività, pertanto è intuibile quale importanza possa avere l'ecocardiografia che permette di investigarne la cinetica in ogni momento (*real time*).

L'ecocardiografia inoltre fornisce immagini di tutte le strutture cardiache e quindi ben si inserisce nell'*iter* diagnostico delle patologie cardiache, per le quali i comuni mezzi di indagine (elettrocardiografici e radiologici) spesso non consentono di formulare con assoluta certezza la diagnosi.

L'esame viene effettuato mediante due tecniche denominate *B-mode* e *M-mode*.

Tecnica *B-mode* - Mediante questa indagine è possibile registrare tomogrammi o sezioni cardiache in una serie pressoché infinita, secondo vari piani rispetto all'asse cardiaco; l'orientamento spaziale facilita il riconoscimento delle strutture cardiache, dando un'immagine "reale" delle strutture esaminate.

Tecnica *M-mode* - La metodica permette di misurare le strutture cardiache, analizzare la cinetica valvolare, valutare la contrattilità del miocardio e le correlazioni temporali degli eventi intracardiaci.

Con essa è tuttavia possibile ottenere solo un ristretto campo di visione (monodimensionale) che non consente di rilevare agevolmente alcuni aspetti patologici, ad esempio i difetti dei setti interatriale ed interventricolare, la presenza di masse parietali o intracavitarie, ecc.

A grandi linee si potrebbe dire che la *B-mode* è una tecnica che fornisce informazioni di tipo qualitativo e la *M-mode* di tipo quantitativo. A tale proposito, mentre la monodimensionale è un'indagine basata su rilevamenti numerici e quindi oggettivi, la bidimensionale è anche frutto di rilievi soggettivi, che molto dipendono dall'esperienza di chi conduce l'esame.

Metodologia

Per effettuare un corretto esame ecocardiografico nel cane sono necessari alcuni accorgimenti, che riportiamo in tabella.

Tabella

- Ambiente tranquillo e scarsamente luminoso
- *Gel* ultrasonico
- Piano d'appoggio
- Sonde

L'esame pur non essendo traumatizzante, per la sua lunga durata (da

mezz'ora ad un'ora) impone che il soggetto si trovi in ambiente tranquillo e scarsamente illuminato.

Allo scopo di favorire la conduzione del fascio di ultrasuoni attraverso le diverse strutture di superficie che si interpongono tra la sonda e l'organo da investigare, si utilizza un *gel* ultrasonico che deve essere applicato in abbondanza, massaggiando per favorire la penetrazione tra i peli. Si deve inoltre ripetere frequentemente tale operazione nel corso dell'esame.

Un dato che non bisogna ignorare è che la qualità delle immagini ottenute può essere negativamente influenzata dalla sovrapposizione del polmone alle strutture cardiache (particolarmente durante l'inspirazione). Nell'uomo si ovvia a tale inconveniente invitando il paziente a trattenere il respiro al termine di una profonda espirazione. Nel cane, per favorire l'"aderenza" del cuore alla parete toracica, si esegue l'esame ponendo l'animale in decubito laterale e si opera con la sonda sul lato di decubito stesso. Presso il nostro Istituto utilizziamo un tavolo con piano d'appoggio forato; questo accorgimento consente di applicare la sonda sul lato di decubito.

Le sonde da noi impiegate sono di tipo settoriale meccanico. Per quanto riguarda la scelta del trasduttore va ricordato che la risoluzione è tanto maggiore quanto più la frequenza è alta, ma la capacità di penetrazione in profondità diminuisce proporzionalmente; pertanto si impiegano sonde a maggior frequenza (5-3,5 MHz) per esaminare soggetti di medie-piccole dimensioni e quelle a frequenza minore (2,8-2,5 MHz) per cani di grossa mole.

Le scansioni in tecnica monodimensionale si registrano mantenendo il soggetto in decubito laterale ed operando con la sonda tra il II ed il IV spazio intercostale dello stesso lato. Questa metodica consente di evidenziare il ventricolo destro, il setto interventricolare, il ventricolo sinistro, la valvola mitrale, la valvola aortica e la parete posteriore del ventricolo sinistro (foto 1). Questa tecnica è la preferibile per effettuare una valutazione quantitativa delle strutture cardiache; è infatti possibile misurare spessori, diametri, tempi di chiusura e apertura dei lembi valvolari, ecc.

La tecnica *B-mode* offre scansioni diverse a seconda del lato sul quale si appli-

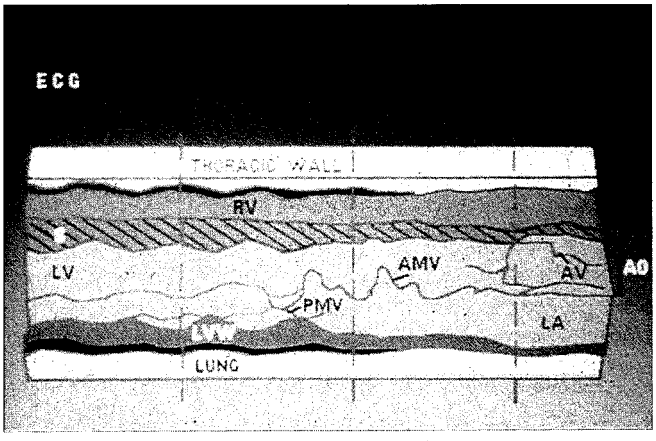
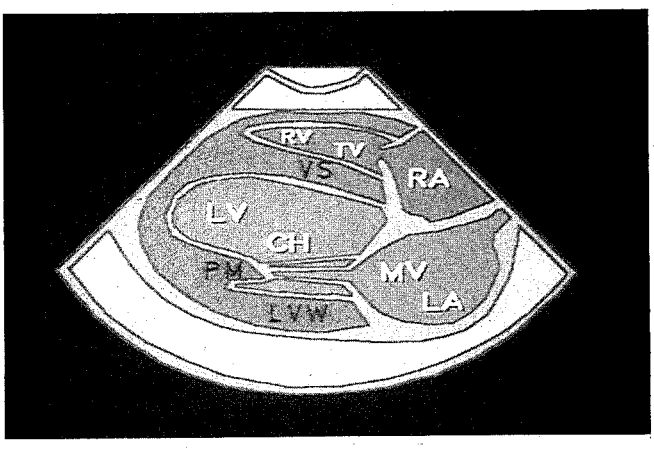
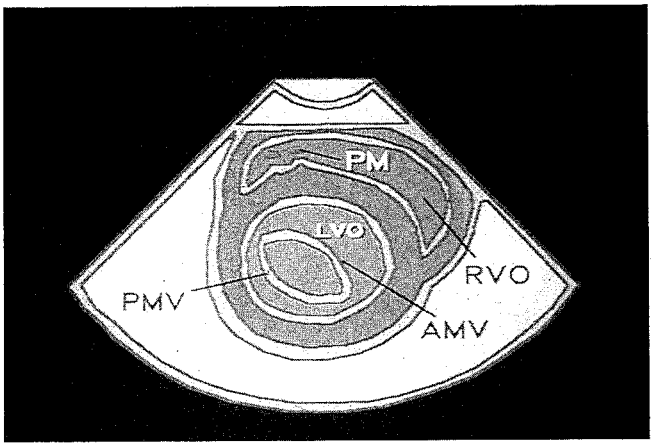


Foto 1 - **Rappresentazione schematica di una scansione *M-mode***
RV: ventricolo destro
S: setto interventricolare
LV: ventricolo sinistro
AMV: lembo anteriore della valvola mitrale
PMV: lembo posteriore della valvola mitrale
AO: aorta
AV: valvola semilunare aortica.

Disegno 1 - **Decubito laterale destro**
Scansione asse lungo
RA: atrio destro
TV: valvola tricuspide
RV: ventricolo destro
VS: setto interventricolare
LA: atrio sinistro
MV: valvola mitrale
CH: corde tendinee
LV: ventricolo sinistro
PM: muscoli papillari
LVW: parete del ventricolo sinistro



Disegno 2 - **Decubito laterale destro**
Scansione asse corto dei ventricoli a livello della valvola mitrale (in diastole)
RVO: tratto di efflusso del ventricolo destro
LVO: tratto di efflusso del ventricolo sinistro
AMV: lembo anteriore della valvola mitrale
PMV: lembo posteriore della valvola mitrale
PM: muscoli papillari



ca la sonda. Sul lato destro la finestra acustica è molto ampia e si estende dal III al VII spazio intercostale.

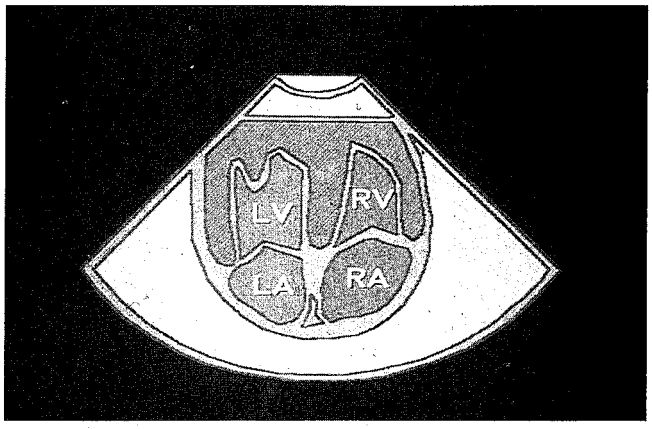
Nei disegni 1 e 2 sono illustrate schematicamente le principali scansioni ecocardiografiche di destra.

Nella visione asse lungo (disegno 1), si possono osservare gli atri ed i ventricoli, separati dai propri setti, le valvole mitrale e tricuspide, i muscoli papillari e le corde tendinee; in asse corto (disegno 2) si visualizza la sezione trasversa della valvola mitrale e le regioni di efflusso dei ventricoli destro e sinistro.

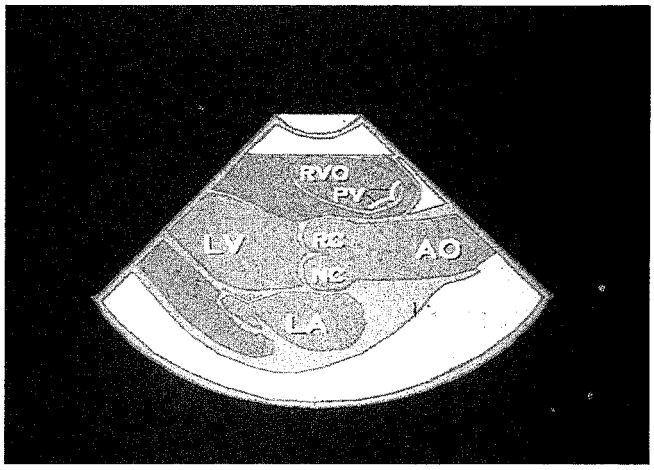
Sul lato sinistro del torace la finestra acustica è tra il III e il VI spazio intercostale.

Nella scansione quattro camere o apicale (disegno 3) si evidenziano gli atri ed i ventricoli oltre che le valvole atrioventricolari.

In asse lungo si possono visualizzare l'atrio ed il ventricolo sinistro, la valvola aortica con le cuspidi non coronarica e destra, il tratto emergente dell'arteria



Disegno 3 - **Decubito laterale sinistro**
Scansione quattro camere apicale
LV: ventricolo sinistro
RV: ventricolo destro
LA: atrio sinistro
RA: atrio destro



Disegno 4 - **Decubito laterale sinistro**
Scansione asse lungo della regione di efflusso del ventricolo sinistro
RVO: tratto di efflusso del ventricolo destro
PV: valvola polmonare
LV: ventricolo sinistro
RC: cuspide destra della valvola semilunare aortica
NC: cuspide non coronarica della valvola semilunare aortica
AO: aorta
LA: Atrio sinistro.

aorta ed il tratto di efflusso del ventricolo destro con la valvola polmonare (disegno 4).

Aspetti ecocardiografici di alcune patologie cardiache

Le indagini ecocardiografiche sono un valido supporto per la diagnosi delle malattie cardiache congenite ed acquisite.

Per quando riguarda le prime, sono identificabili le displasie valvolari e i difetti dei setti interatriale ed interventricolare. Tra le affezioni acquisite dell'endocardio parietale e valvolare vanno ricordati i trombi, la rottura delle corde tendinee con i prolassi, oltreché la fibrosi dei lembi valvolari. L'esame ecocardiografico è di fondamentale importanza nella diagnosi delle miocardiopatie (dilatazione, ipertrofia) e delle discinesie localizzate o diffuse.

L'esame ultrasonografico permette inoltre di rilevare agevolmente la presenza di processi infiammatori e versamenti del pericardio. Questa tecnica consente infine di evidenziare masse intracavitarie o parietali.

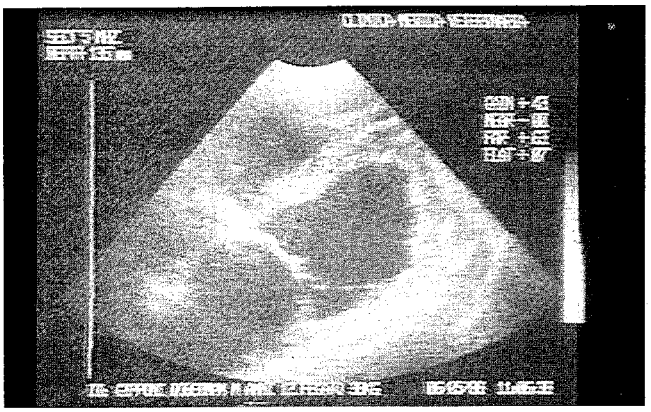


Foto 2 - **Scansione asse lungo dell'atrio e del ventricolo sinistro e del ventricolo destro**
Valvulopatia mitralica: ispessimento ed ipomotilità dei lembi valvolari

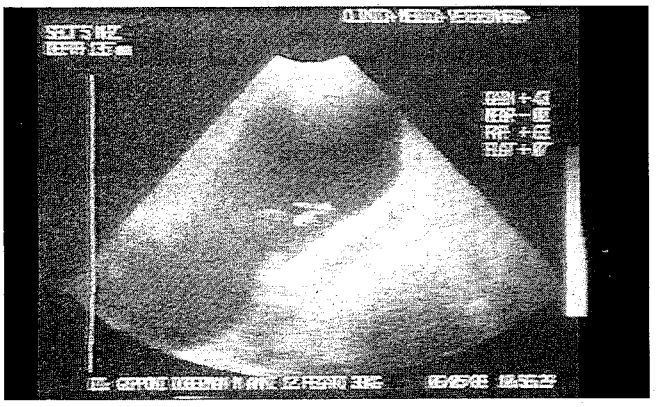


Foto 3 - **Scansione asse lungo dell'atrio e del ventricolo sinistro**
Valvulopatia mitralica: calcificazione delle corde tendinee.

Endocardio

Le principali affezioni valvolari acquisite nel cane riguardano la valvola mitrale. L'apparato valvolare atrioventricolare costituisce un'unità funzionale formata da un insieme di strutture ben identificabili da un punto di vista ecografico e, pertanto, nella diagnosi di lesioni della valvola mitrale, si dovranno esaminare tutte le parti che possono essere coinvolte nel processo patologico: anello valvolare atrioventricolare, lembi valvolari, corde tendinee e muscoli papillari.

Nella ricerca delle valvulopatie occorre considerare sia i reperti diretti o specifici, dovuti all'interessamento dell'unità funzionale, sia i reperti indiretti, dovuti al coinvolgimento di strutture non valvolari, quali ad esempio l'aumento dei diametri delle camere cardiache e le alterazioni della cinetica miocardica. L'aspetto fondamentale che si riscontra in caso di sindrome mitralica è rappresentato da un ispessimento dei lembi valvolari (foto 2) con limitata escursione degli stessi.

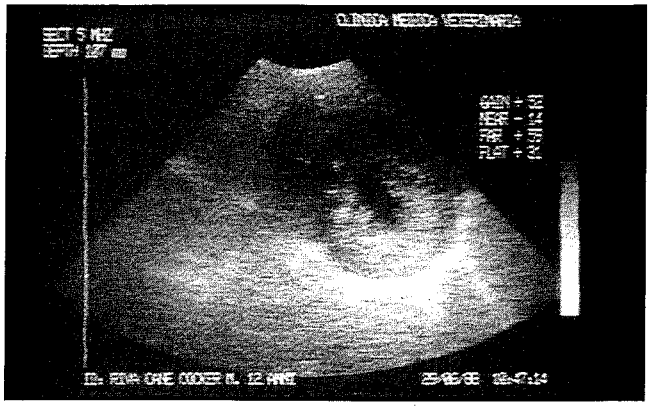


Foto 4 - **Scansione asse corto del ventricolo sinistro in sistole Miocardiopatia ipertrofica.**

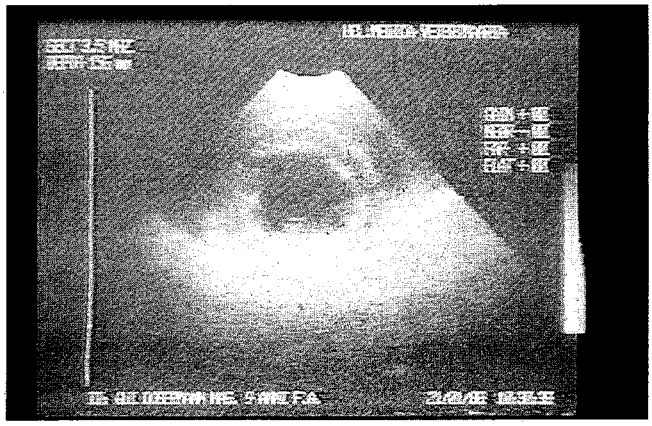


Foto 5 - **Scansione asse corto del ventricolo sinistro in sistole Miocardiopatia dilatativa**

La lesione è spesso accompagnata da interessamento dell'apparato sottovalvolare, in particolare delle corde tendinee, riferibili a calcificazione che appaiono come echi localizzati, intensamente riflettenti (foto 3).

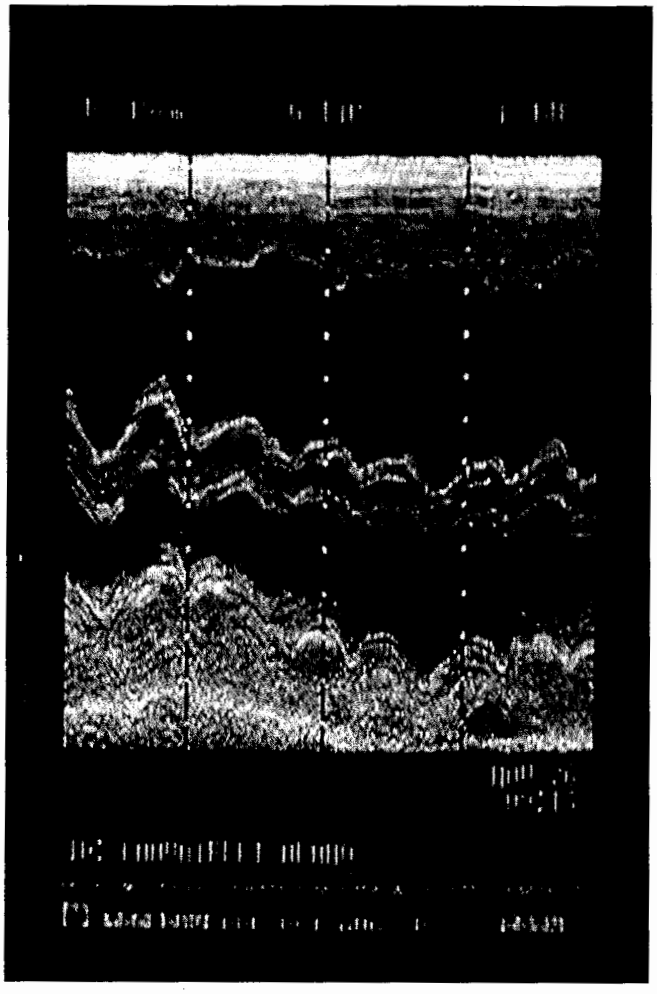
Nei casi più gravi, alla lesione valvolare si accompagna una dilatazione dell'atrio sinistro ed eventualmente della cavità ventricolare.

Miocardio

Le alterazioni miocardiche elettivamente identificabili mediante esame ecocardiografico sono rappresentate dalle variazioni di spessore delle pareti e del diametro delle cavità cardiache. È possibile inoltre valutare le alterazioni della contrattilità del muscolo cardiaco.

L'aspetto ecocardiografico della miocardiopatia ipertrofica è caratterizzato da: abnorme ispessimento del setto e della parete ventricolare sinistra, riduzione del diametro della cavità ventricolare sinistra, ipertrofia dei muscoli papillari che possono protundere nella camera di efflusso del ventricolo sinistro du-

Foto 6 - **Scansione del ventricolo sinistro del setto interventricolare e del ventricolo destro Discinesie miocardiche**



rante la sistole, ed anormale (aumentata) ecoriflettenza del miocardio interessato dall'ipertrofia (foto 4).

La cardiomiopatia dilatativa si presenta, in tecnica *B-mode*, con una dilatazione globale delle cavità cardiache ed in particolare del ventricolo sinistro, riduzione dello spessore delle pareti e marcata ipocinesia del miocardio ventricolare sinistro. La cavità ventricolare sinistra in asse corto (foto 5) si presenta pressoché sferica e poco visibili risultano i muscoli papillari. Le escursioni sistodiastoliche parietali sono globalmente ridotte.

Le discinesie delle pareti miocardiche si manifestano in corso di ischemie localizzate o diffuse del miocardio, e risultano ben evidenti in tecnica monodimensionale, in quanto con una sola immagine sono visibili e confrontabili più cicli cardiaci (foto 6).

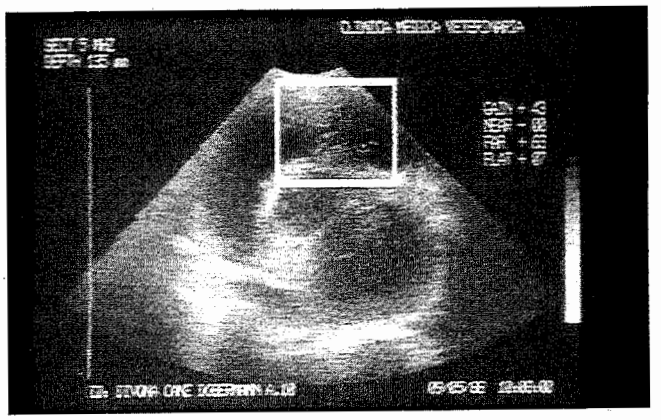


Foto 7 - **Scansione asse corto del ventricolo destro e sinistro; gli echi puntiformi in prossimità della valvola polmonare sono determinati dalle filarie (rettangolo giallo).**

Foto 8 - **Versamento pericardico: lo spazio ecoprivo (nero) che circonda il cuore rappresenta il versamento che separa i foglietti pericardici.**

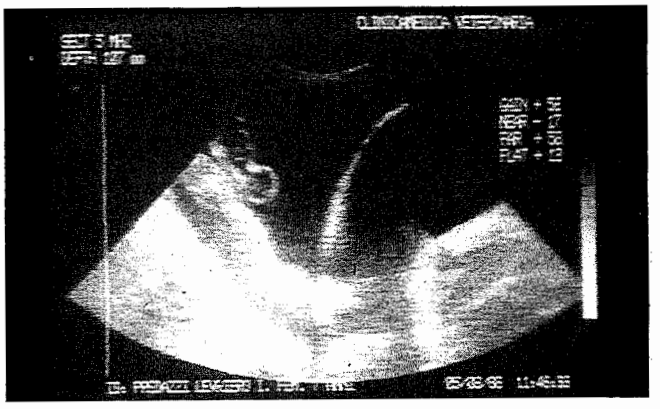
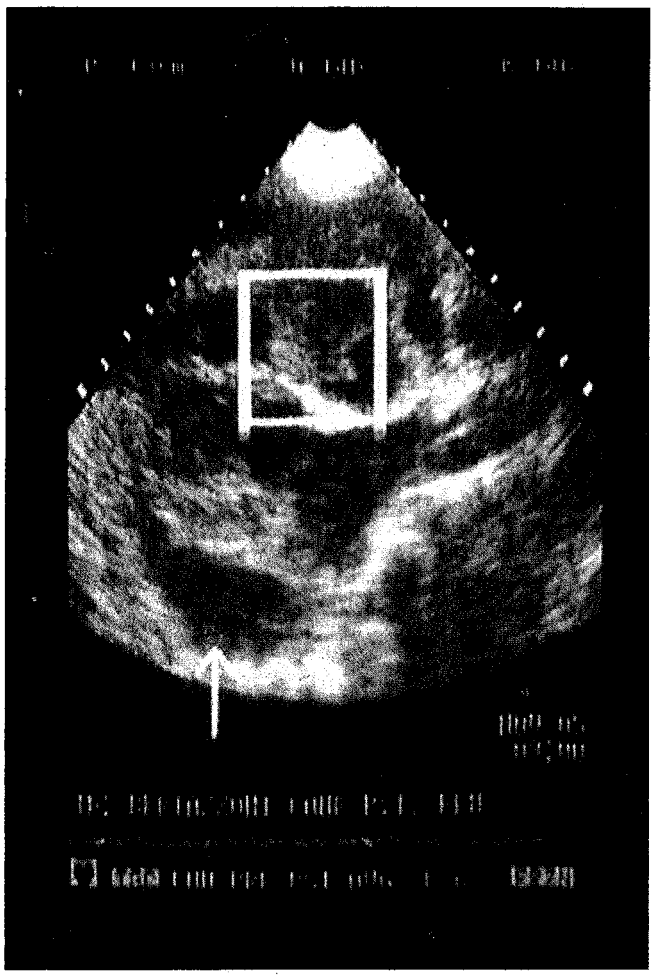


Foto 9 - **Pleuropericardite sierofibrinosa: presenza di strutture fortemente ecoriflettenti, riferibili a filamenti di fibrina, nello spazio pleurico e pericardico abnormemente aumentati per versamento.**

Foto 10 - **Neoplasia cardiaca (emoangiosarcoma)**
Massa neoplastica localizzata in prossimità dell'atrio destro (rettangolo giallo) e versamento pericardico di modesta entità (frec-cia).



Un cenno a parte meritano gli aspetti ecocardiografici nel corso di infestione da filaria. I parassiti, se presenti in grande numero, possono rendersi visibili sotto forma di echi puntiformi mobili in prossimità della valvola polmonare. L'interessamento del cuore destro è inoltre confermato da un aumento di diametro della cavità ventricolare stessa (foto 7).

Pericardio

I versamenti pericardici, per le loro caratteristiche acustiche significativamente differenti da quelle del miocardio, si presentano come uno spazio relativamente libero da echi (nero), tra i foglietti del pericardio. Si può inoltre osservare la compressione prolungata della parete libera dell'atrio destro ed il collasso protodiastolico del ventricolo destro.

La sensibilità della metodica ecocardiografica nella diagnosi di versamento pericardico nel cane è molto elevata; essa infatti permette di discriminare se la

natura dell'essudato sia prevalentemente liquida (foto 8) o mista per la presenza di lacinie fibrinose (foto 9).

È possibile inoltre mettere in evidenza un coinvolgimento delle strutture contigue al pericardio (versamenti pleurici, pleuriti fibrinose, neoplasie del miocardio parietale) (foto 9 -10);

Conclusioni

L'esame ecocardiografico nella clinica del cane risulta essenziale dove la visita cardiologica, l'elettrocardiogramma e l'esame radiologico non consentono un'univoca diagnosi.

Va tuttavia ricordato che i buoni risultati di un ecocardiogramma dipendono non solo dalla scrupolosa applicazione delle tecniche illustrate, ma anche dalla conoscenza dell'anatomia cardiaca e dall'esperienza del clinico che conduce l'esame; infatti la grande variabilità tra le razze canine impone adattamenti, caso per caso, delle tecniche di base.

BIBLIOGRAFIA

1) Boccanelli A., Gambelli G.,(1984): Ecocardiografia mono e bidimensionale. Edizioni Il Pensiero Scientifico, Roma.
2) Bonagura J.D., Pipers F.S. (1981): Echocardiographic features of pericardial effusion in dogs. JAVMA, *179*, 49.
3) Bonagura J.D. (1987): Cardiology. Edizioni Churchill Livingstone, New York.
4) Boon J. Ecole (1983): Echocardiographic indices in the normal dog. Veterinary Radiology, *24*, 214-221.
5) Brambilla P.G., Ferro E., (1988): Un cuore senza segreti. Sc. Vet. Biol. Anim., *1*, 15-22.
6) Ettinger S.J., Suter P.F. (1985): Canine Cardiology. Edizioni W.B. Saunders.
7) Feigenbaum H. (1985): Ecocardiografia. Edizioni Piccin, Padova.
8) Le Bobinnec G. (1987): Interet diagnostique de l'echocardiographie bidimensionnelle chez les carnivores. Recueil de Médecine Vétérinaire, *163* , 757-761.
9) Le Bobinnec C. (1988): Echocardiographie bidimensionnelle et cardiopathies du chien. Recueil de Médecine Vétérinaire, *164* , 151-156.
10) Lombard C.W., Buergelt C.D. (1983): Vegetative bacterial endocarditis in dogs; echocardiographic diagnosis and clinical signs. J. Small. Anim. Pract., *24*, 325.
11) Lombard C.W. (1984): Echocardiographic and clinical signs of canine dilated cardiomiopathy. JAVMA, *25*, 59.
12) Lombard C.W. (1984): Normal valves of the canine M-mode echocardiogram. Am. J. Vet. Res., *45*, 10.
13) Lombard C.W., Spencer C.P. (1985): Correlation of radiographic echocardiographic and electrocardiographic sings of left heart enlargement in dogs with mitral regurgitation. Vet. Radiology, 26, 89-97.
14) O'Grady M.R., Ecole (1986): Quantitative cross-sectional echocardiography in the normal dog. Vet. Radiology, 27, 34-49.
15) Thomas W.P., Ecole (1984) Detection of cardiac masses in dogs by two-dimensional echocardiography. Vet. Radiology, *25*, 65.
16) Thomas W.P. (1984): Two- dimensional, real-time echocardiography in the dog. Vet. Radiology, *25*, 50-64.
17) Tilley L.P. (1984) Tecniche diagnostiche cardiopolmonari. Edizioni Delfino, Roma.
18) Tilley L.P. (1985): Manual of small animal cardiology. Edizioni Churchill Livingstone, New York.

Lorizio R.[1], **Brunetti A.**[2]
[1]Centro di Radiologia Veterinaria (Dir. Prof. Potena A.)
Facoltà di Medicina Veterinaria - Università di Napoli
[2]Cattedra di Medicina Nucleare (Titolare: Prof. Salvatore M.)
IIª Facoltà di Medicina e Chirurgia - Università di Napoli

La Medicina Nucleare, la Tomografia Assiale Computerizzata e la Risonanza Magnetica Nucleare: possibilità di impiego in medicina veterinaria

Introduzione

Negli ultimi venti anni la diagnostica per immagini ha subìto una costante evoluzione sino ad arrivare, con l'avvento dei computers, ad una definizione quasi perfetta di parti interne dell'organismo.

Scopo di questa breve relazione è quello di illustrare alcuni dei nuovi metodi di diagnostica per immagini, attualmente appannaggio quasi esclusivo della medicina umana, dato l'alto costo delle apparecchiature, che potrebbero essere utilizzati anche in campo veterinario.

L'espressione "diagnostica per immagini" individua l'insieme delle tecniche che comprendono: la Radiologia tradizionale e le più recenti tecniche di diagnostica assistita dai computers come ad esempio la Radiologia Digitale, la Medicina Nucleare, l'Ecografia, la Tomografia Assiale Computerizzata, la Risonanza Magnetica Nucleare, la Tomografia ad Emissione di Singoli Fotoni (PECT) e la Tomografia ad Emissione di Positroni (PET).

La computerizzazione delle tecniche diagnostiche è destinata a modificare anche la radiografia tradizionale non tanto nei principi fisici di formazione delle immagini ma soprattutto nella modalità di produzione e di conservazione delle stesse. Lo sviluppo di sistemi recettoriali ad alta risoluzione e di sistemi di archiviazione su nastri, dischi magnetici e dischi ottici, potrà tra l'altro determinare in un prossimo futuro la scomparsa della tradizionale pellicola radiografica.

Tra le tecniche di diagnostica per immagini la Medicina Nucleare ha un ruolo particolare che comporta valutazioni di carattere funzionale e metabolico piuttosto che di carattere strettamente morfologico.

La medicina nucleare utilizza degli isotopi radioattivi a scopo diagnostico e terapeutico (radio-terapia metabolica cui non si ricorre ancora in campo veterinario), in particolare la diagnostica medico- nucleare *in vivo* si serve di molecole (radiofarmaci) marcate con isotopi emettitori di raggi gamma per ottenere immagini diagnostiche dette "scintigrafie".

Le immagini scintigrafiche sono in pratica delle mappe di distribuzione dei radiofarmaci negli organi presi in esame.

La captazione di un radiofarmaco da parte di un organo riflette le sue carat-

teristiche funzionali e metaboliche: ad esempio, lo studio scintigrafico del fegato si effettua con la somministrazione di colloidi marcati con tecnezio, utilizzando la capacità colloidopessica delle cellule del sistema reticolo endoteliale del fegato.

Le scintigrafie si ottengono con l'impiego di apparecchiature (gamma-camere) in grado di rivelare le radiazioni emesse dall'organo in esame.

Il collegamento del computer alla gamma-camera consente di digitalizzare le immagini scintigrafiche e di monitorare le variazioni temporali delle concentrazioni dei radiofarmaci eseguendo indagini "dinamiche".

Con queste immagini dinamiche è possibile determinare in maniera non invasiva parametri funzionali e metabolici.

Le tecniche di diagnostica *in vitro* non rientrano nel campo della diagnostica per immagini ma vengono utilizzate prevalentemente per effettuare dosaggi di sostanze presenti nei liquidi biologici in concentrazioni molto basse come ormoni, farmaci, *markers* tumorali, ecc.; queste tecniche comprendono i dosaggi radioimmunologici (RIA) ed immunoradiometrici (IRMA).

Esamineremo in breve le possibilità di utilizzo della medicina nucleare nei diversi organi ed apparati.

Apparato scheletrico

Lo studio dell'apparato scheletrico si effettua con la scintigrafia ossea mediante l'impiego di metilendifosfonati marcati con tecnezio-99m. Questi radiofarmaci vengono captati dalle strutture ossee in misura proporzionale alla attività osteoblastica.

Il quadro scintigrafico normale è caratterizzato dalla distribuzione simmetrica del radiofarmaco nei vari segmenti scheletrici. I reperti patologici si presentano in genere come aree di iperaccumulo del radiofarmaco (aree calde); possono essere cause di iperaccumulo: tumori primitivi e secondari, fratture recenti, osteomieliti ed osteoperiostiti.

La scintigrafia ossea è caratterizzata da alta sensibilità e può individuare lesioni neoplastiche molto prima che si evidenzino radiologicamente, tuttavia si tratta di un esame relativamente aspecifico in quanto i reperti patologici non sempre consentono la diagnosi di natura.

Le indicazioni della scintigrafia ossea includono la ricerca di metastasi ossee, in particolare nella valutazione preoperatoria, per determinare estensione, numero ed attività di lesioni primarie o secondarie; per stabilire la presenza di una frattura non evidenziabile radiologicamente e consentire biopsie ossee mirate.

Apparato endocrino

Tra gli organi dell'apparato endocrino, la tiroide è quello più frequentemente studiato in medicina nucleare. La scintigrafia tiroidea si realizza con la somministrazione di iodio 131 o 123 in forma di ioduro, o più frequentemente di tecnezio- 99m sotto forma di pertecnetato utilizzando il meccanismo fisiologico di captazione degli ioduri.

L'indagine consente di differenziare formazioni nodulari iperattive (noduli caldi) rispetto alle formazioni ipometaboliche (noduli freddi).

Apparato emopoietico, milza e apparato linfatico

La scintigrafia osteo-midollare si utilizza per lo studio della distribuzione del midollo emopoietico.

La somministrazione di nano-colloidi marcati con tecnezio-99m consente, infatti, la visualizzazione della estensione e di eventuali patologie del tessuto emopoietico.

L'esame è indicato nello studio di malattie emolinfoproliferative e nella valutazione della risposta alla terapia nei soggetti con malattie che comportano invasione o involuzione midollare.

La milza può essere studiata con la somministrazione di colloidi marcati sempre con tecnezio nel corso dell'epatoscintigrafia, l'esame consente di individuare lesioni focali e la morfovolumetria dell'organo.

Lo studio dell'apparato linfatico con tecnica scintigrafica prevede la somministrazione del tracciante negli spazi cellulari lassi (ad esempio spazi interdigitali anteriori o posteriori).

Questa tecnica consente la valutazione della funzionalità delle vie di drenaggio, in maniera atraumatica, diversamente dalla linfografia radiologica che richiede l'incannulamento del vaso linfatico e la somministrazione del mezzo di contrasto sotto pressione.

Mentre i linfonodi normali sono in grado di captare il radiocolloide, i linfonodi invasi da tessuto patologico non saranno evidenti nell'immagine scintigrafica.

La valutazione di normalità si basa sulla simmetria e continuità di captazione del radiocolloide da parte delle catene linfatiche.

Apparato cardiovascolare

Esistono due tecniche di studio del cuore: l'angiocardiografia radioisotopica e la scintigrafia perfusionale miocardica.

La prima si effettua o con lo studio del primo passaggio (*first pass*) di un bolo radioattivo attraverso le camere cardiache o con lo studio dell'equilibrio dopo somministrazione di un tracciante intravascolare. Quest'esame consente di misurare la funzione contrattile ventricolare globale e regionale e, con la tecnica del primo passaggio, l'entità di *shunts* ed i tempi di transito nel circolo polmonare.

Le indicazioni includono le cardiopatie congenite ed acquisite (cardiomiopatie e cardiopatie ischemiche).

La scintigrafia perfusionale miocardica può essere utilizzata per individuare alterazioni regionali della perfusione (ischemie ed infarti). Per questo esame viene utilizzato il tallio-201, che viene captato dalle fibrocellule miocardiche normali.

Le aree infartuali si evidenziano scintigraficamente come aree di ipocaptazione (aree fredde).

Per lo studio delle trombosi si possono utilizzare oggi anticorpi antifibrina radiomarcati che possono accumularsi nei vasi dove è in corso un processo trombotico, dando un'immagine scintigrafica di ipercaptazione.

Apparato respiratorio

La scintigrafia polmonare perfusionale viene utilizzata con somministrazione di macroaggregati di albumina per lo studio della perfusione regionale. La somministrazione di gas o aerosol radiomarcati per via inalatoria consente invece lo studio della ventilazione regionale.

I due esami effettuati in successione potrebbero essere impiegati per lo studio e la diagnosi di embolia polmonare.

La scintigrafia con gallio citrato viene invece utilizzata per la ricerca di focolai neoplastici e infiammatori che appaiono come aree calde.

Fegato

Per lo studio del fegato utilizziamo due metodiche basate sull'impiego di due diversi radiofarmaci: la scintigrafia epatica e la scintigrafia epato-biliare. La prima fa uso di colloidi marcati con tecnezio captati dalle cellule del sistema reticolo-endoteliale,e la seconda fa uso di derivati dell'acido iminodiacetico (HIDA) che consente di studiare la funzione escretoria biliare.

La scintigrafia epatica viene utilizzata per la valutazione di lesioni occupanti spazio (neoplasie primitive e secondarie) e di epatopatie diffuse.

Quest'indagine rappresentava, prima dell'introduzione dell'ecografia e della TC, l'unica tecnica non invasiva per lo studio del fegato; oggi le sue indicazioni sono più limitate e l'esame è spesso eseguito con tecnica tomoscintigrafica. Per **tomoscintigrafia** s'intende una tecnica di formazione di immagini tomografiche corrispondenti a piani di scansione trasversali, sagittali o coronali (SPECT = *single photon emission tomografy*).

Questa tecnica ha una maggiore accuratezza diagnostica rispetto alla scintigrafia planare convenzionale nello studio delle lesioni focali epatiche.

Maggiore interesse diagnostico ha oggi la scintigrafia epatobiliare, con cui è possibile valutare la morfologia epatica nella fase di captazione epatocitaria del tracciante e, successivamente, la funzionalità e la normale pervietà delle vie biliari principali e della colecisti.

Apparato urinario

Per lo studio del rene e delle vie urinarie viene utilizzata la scintigrafia renale sequenziale, che prevede la valutazione della *clearance* renale di un radiofarmaco (tecnezio-99m-DTPA o iodio-131-Hippuran) con l'impiego di una gamma camera collegata ad un computer. La valutazione dinamica della fase vascolare, della captazione renale e della escrezione renale del tracciante consente di evidenziare alterazioni unilaterali e globali dei tempi di transito dei radiofarmaci, e di determinare in maniera non invasiva la velocità di filtrazione glomerulare renale (con DTPA) e il flusso plasmatico renale (con l'Hippuran).

Per la individuazione di tessuto renale (ad esempio nella ricerca di reni ectopici) si utilizza la scintigrafia renale statica con tecnezio-99m-DMSA.

Tomografia Computerizzata

La Tomografia Computerizzata (TC) ha determinato una svolta storica nella diagnostica per immagini già a partire dagli anni settanta.

Con la TC, infatti, è possibile ottenere una valutazione tridimensionale delle strutture interne del corpo attraverso la visualizzazione di piani di scansione, in genere trasversali (assiali) che possono essere integrati da ricostruzioni elettroniche in piani sagittali e coronali.

L'immagine tomografica viene ottenuta con la ricostruzione al computer dei valori locali di attenuazione dei raggi X (densità), a partire dai profili di attenuazione determinati in proiezioni multiple.

Il "cuore" del sistema TC è costituito da un sistema a "tubo radiogeno ruotante" e da una serie di rivelatori contigui che consentono di ottenere i suddetti profili di attenuazione.

I moderni apparecchi TC consentono di ottenere, grazie alla disponibilità di computers ad alta velocità, immagini in tempo quasi reale (2-3 secondi dopo il termine della scansione).

La durata della scansione varia a secondo dell'organo sede dell'esame: per il cranio, ad esempio, vengono impiegate scansioni di 5-7 sec., mentre per torace ed addome è indispensabile che le scansioni non superino i 2-3 sec., in quanto i movimenti respiratori possono determinare la comparsa di artefatti nelle immagini. Questo problema è particolarmente sentito nella radiologia veterinaria poiché non si può ottenere un'apnea spontanea.

A seconda del tipo di apparecchio e dell'organo sede dell'esame, vengono utilizzati piani di spessore variabile da 1 a 10 mm.

La TC è dotata di un'elevata risoluzione spaziale e di contrasto.

In rapporto al tipo di organo ed alla apparecchiatura utilizzata possono esser evidenziate lesioni con diametro fino a 2-3 mm.

La differenziazione di strutture patologiche rispetto alle normali può essere incrementata con la somministrazione di mezzo di contrasto iodato in quantità inferiore, rispetto alla radiologia tradizionale, con la possibilità di discriminare le strutture vascolari dagli organi viciniori, di valutare il grado di vascolarizzazione e la permeabilità capillare di processi patologici.

Nello studio del sistema nervoso centrale, la TC ha un ruolo di primaria importanza perché consente di ottenere informazioni precise circa possibili alterazioni del parenchina cerebrale quali: lesioni vascolari (infarti, emorragie, aneurismi, ecc.), lesioni infiammatorie (ascessi) e processi neoplastici primitivi e secondari. Per lo studio delle malformazioni vascolari e per i processi caratterizzati da rottura della barriera emato-encefalica l'esame TC viene eseguito anche dopo somministrazione di mezzi di contrasto in vena.

I diversi quadri patologici vengono differenziati in base alle loro caratteristiche densitometriche. Ad esempio le aree emorragiche recenti presentano una densità superiore rispetto al parenchima normale, mentre le lesioni ischemiche si presentano ipodense; i processi espansivi neoplastici mostrano aspetti den-

sitometrici variabili a seconda del tipo e del grado di malignità, della vascolarizzazione, della permeabilità capillare, della presenza di aree di necrosi (ipodense) e di calcificazioni.

La TC consente di valutare precisamente gli effetti di compressioni e dislocazioni del parenchima cerebrale determinati da processi espansivi.

La TC ha un ruolo rilevante anche nello studio della patologia vertebro-midollare per l'individuazione di ernie del disco e di spondilopatie che possono determinare stenosi dei fori di coniugazione e dello stesso canale vertebrale.

A livello toracico l'esame TC è particolarmente utile nella valutazione di lesioni espansive polmonari e mediastiniche, specialmente per la possibilità di un'accurata analisi densitometrica e tridimensionale molto utile in fase pre-operatoria.

Scarsa applicazione, attualmente anche in base alla nostra esperienza, riveste la TC nello studio del cuore, che essendo un organo in continuo movimento determina immagini ricche di artefatti e quindi scarsamente utilizzabili a scopo diagnostico.

A livello addominale la TC presenta numerose possibilità di applicazione, particolarmente nella ricerca di masse occupanti spazio a carico di tutti gli organi.

Anche in ambito addominale, così come in quello toracico, l'esame TC ha il notevole vantaggio di consentire un accurato bilancio spaziale dei processi espansivi in fase pre-operatoria.

La TC non presenta a nostro avviso particolari indicazioni nello studio dell'apparato muscolo-scheletrico.

Risonanza Magnetica Nucleare

La Risonanza Magnetica Nucleare (RMN) è una tecnica di formazione di immagini radicalmente innovativa, che si basa sull'impiego di campi magnetici e

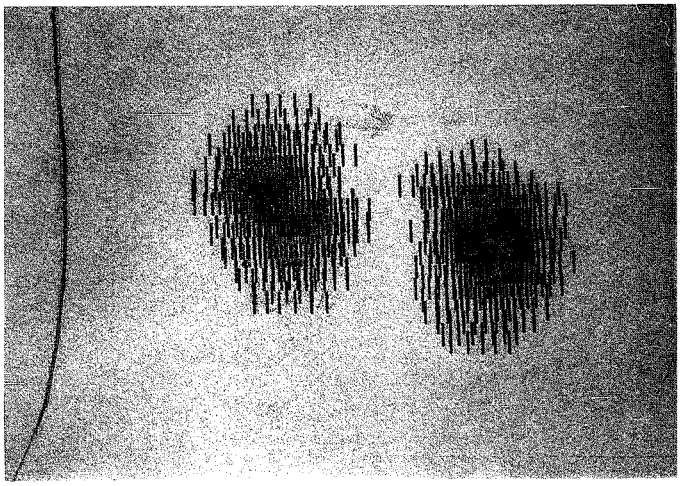


Figura 1 - **Scintigrafia tiroidea nel cane. Immagine scintigrafica di una tiroide normale in un cane di anni sei. Esame eseguito con *scanner*.**

non di radiazioni ionizzanti. Il fenomeno RMN è caratteristico dei nuclei atomici dotati di un numero dispari di protoni e/o di neutroni.

Questi nuclei sono dotati di *spin* cioé ruotano attorno al proprio asse e, se sottoposti all'azione di un campo magnetico, si comportano come dei piccoli aghi magnetici. In particolare i nuclei dell'idrogeno, l'elemento che viene utilizzato per l'*imaging* RMN, sottoposti all'azione di un campo magnetico possono assumere un orientamento parallelo o antiparallelo nei confronti della direzione del campo. L'asse di rotazione dei nuclei descrive un movimento circolare (di pressione) caratterizzato da una frequenza angolare che è funzione dell'intensità del campo magnetico. In tali condizioni è possibile mettere in risonanza, cioè far assorbire energia ai nuclei di idrogeno, con l'impiego di un campo magnetico oscillante alla frequenza di pressione dei nuclei. Terminata la sollecitazione con il campo oscillante, i nuclei cedono l'energia assorbita (si "rilassano") emettendo radiofrequenze che vengono captate da appositi ricevitori (antenne,

Figura 2 - **Scintigrafia osteo-midollare con somministrazione di monocolloide marcato con tecnezio -99m. Cane Pastore Tedesco di quattro mesi. Esame eseguito con tecnica *total-body* in proiezione ventrale (sx) e dorsale (dx). Normale distribuzione del radiocolloide nel midollo emopoietico che si estende fino alle estremità distali degli arti. Il radiocolloide viene captato anche dal fegato e dalla milza.**

bobine). Il segnale emesso dai nuclei di idrogeno nella fase di rilassamento può essere utilizzato per la formazione di immagini diagnostiche. Il nucleo di idrogeno viene preferito ad altri nuclei biologici dotati di *spin*, per la sua elevata concentrazione nelle strutture biologiche, in particolare nelle molecole di acqua. Nell'*imaging* RMN il soggetto in esame viene inserito in un campo magnetico di elevata intensità (da 6.000 a 30.000 volte più intenso di quello terrestre) e le strutture da esaminare sono sottoposte all'azione di campi magnetici oscillanti (radiofrequenze) create da opportune bobine. La stessa bobina, o una bobina diversa, può essere utilizzata per ricevere il segnale da cui vengono "elaborate" le immagini finali. Il segnale proveniente da strutture diverse del corpo viene individuato grazie ad un processo di codifica spaziale che si basa sull'impiego di gradienti di campo magnetico. L'apparecchio RMN non ha parti meccaniche in movimento e, con la sola modifica elettronica della direzione dei gradienti di campo, consente di ottenere immagini di piani assiali, sagittali, coronali ed obliqui. Inoltre, il segnale RMN è particolarmente ricco di informazioni, poiché esso è funzione di più parametri.

Diversamente dalla radiologia tradizionale e dalla TC in cui il contrasto tra i diversi tessuti riflette solo diversità densitometriche, in RMN il segnale dipende sia dal numero di nuclei "eccitati" sia dalla velocità del processo di rilassamento.

A sua volta la velocità del processo di rilassamento dipende dalle caratteristiche chimico-fisiche del tessuto in esame. I tessuti biologici presentano marcate differenze di velocità di rilassamento, in rapporto alla diversa composizione molecolare; di conseguenza le immagini RMN sono intrinsecamente dotate di un contrasto maggiore rispetto alla TC. Per le sue caratteristiche la RMN si presta in modo particolare allo studio del sistema nervoso centrale e dei tessuti molli.

Va anche ricordato che le immagini, nella RMN, delle strutture vascolari ap-

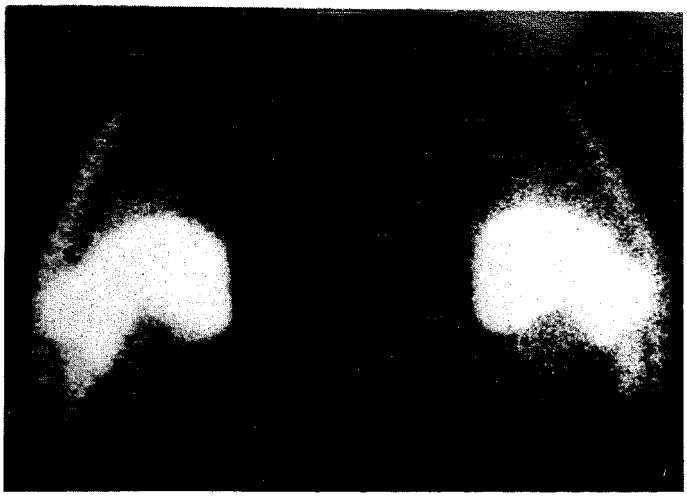


Figura 3 - **Scintigrafia dello stesso soggetto in figura 2 in proiezione laterale dx e sx. Sono evidenti il fegato, la milza ed il midollo osseo dei corpi vertebrali.**

paiono in genere prive di segnale e quindi non è necessaria la somministrazione di mezzi di contrasto per la loro evidenziazione.

Al momento, soprattutto in rapporto ai costi particolarmente elevati, la RMN non trova applicazione pratica in radiologia veterinaria. Indagini sul cane e sul gatto sono in corso essenzialmente a scopo sperimentale ed hanno confermato la particolare sensibilità della RMN nello studio della patologia degenerativa e neoplastica del sistema nervoso.

Conclusioni

Attualmente la diagnostica per immagini è basata sul contributo integrato di diverse tecniche; in campo veterinario si ricorre quasi esclusivamente alle tecniche radiodiagnostiche tradizionali ed all'ultrasonografia.

La medicina nucleare può contribuire in maniera determinante alla valutazione morfo-funzionale di diversi organi ed apparati, mentre la TC e la RMN possono fornire immagini di elevato dettaglio anatomico e rappresentano strumenti insostituibili per diagnosi e monitoraggio post-terapeutico.

Le tecniche sopra descritte non presentano particolari difficoltà di esecuzione; non sono invasive e richiedono esclusivamente una narcosi.

Il ricorso a queste tecniche, per la mancanza di attrezzature pubbliche in Istituti di radiologia veterinaria, attualmente è limitato, e può essere effettuato solo in centri privati.

Ci auguriamo che in un prossimo futuro queste carenze strutturali possano essere colmate, con l'acquisizione di apparecchiature idonee presso le nostre facoltà.

Figura 4 - **Scintigrafia polmonare perfusionale di un cane meticcio di anni sei, effettuata con macroaggregati di albumina marcati con tecnezio- 99m. Normale distribuzione del radiofarmaco nelle proiezioni anteriore, posteriore, laterale dx e laterale sx.**

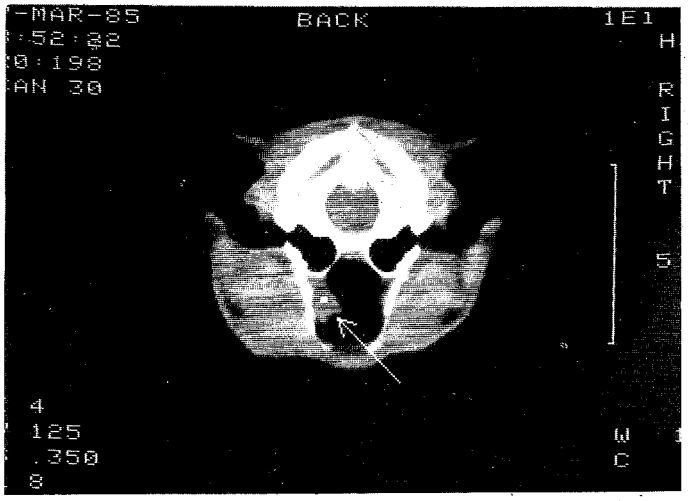


Figura 5 - **Esame TAC del cranio di un gatto di anni quattro, affetto da linfosarcoma. Scansione coronale passante per i meati uditivi. La freccia indica una formazione espansiva linfomatosa protrudente nel lume del faringe.**

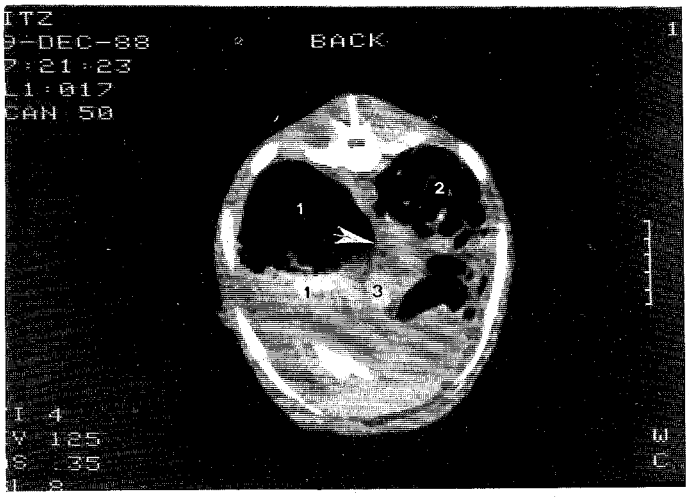


Figura 6 - **Esame TAC dell'addome in un cane Pastore Tedesco di anni sette. Scansione effettuata a livello gastrico dopo somministrazione di mezzo di contrasto (bario) *per os*. Marcata gastrectasia (1) e meteorismo intestinale (2), con visibilità di una formazione espansiva in regione piloro-pancreatica (freccia). Vena cava posterio-re e vena porta (3).**

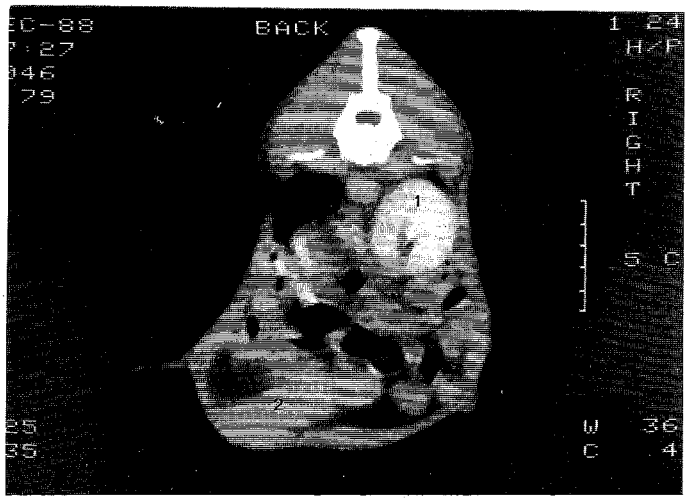


Figura 7 - **Esame TAC dell'addome in un cane Pastore Tedesco di anni cinque, dopo somministrazione di mezzo di contrasto non ionico (iopamidolo). Scansione passante per il rene dx (1) e per il polo posteriore della milza (2).**

Figura 8 - **Esame RMN del cranio di un cane meticcio di anni tre. Scansione sagittale mediana. Sono evidenti il midollo spinale, il tronco cerebrale, il cervelletto e i cervello.**

Figura 9 - **Esame RMN del cranio dello stesso soggetto della figura 8. Proiezione sagittale, bene evidente il lobo olfattorio (freccia).**

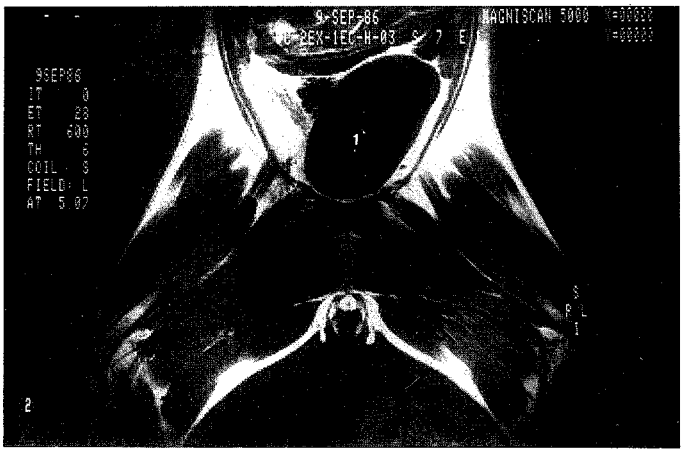


Figura 10- **Esame RMN della pelvi di una cagna di anni quattro. Proiezione coronale passante per la vescica che appare ipo-intensa (1). Ben evidenti i muscoli mediali delle cosce.**

BIBLIOGRAFIA CONSULTATA

1) SALVATORE M., LORIZIO R., POTENA A. (1976): Epatoscintigrafia nel cane. Acta Medica Veterinaria, *22*, 175-181.
2) POTENA A., SALVATORE M., LORIZIO R. (1976): Adenolinfoscintigrafia indiretta nel cane. Acta Medica Veterinaria, *22*, 183-190.
3) LORIZIO R., POTENA A., SALVATORE M. (1978): Valori e limiti della scintigrafia ossea nel cane. Acta Medica Veterinaria, *24*, 1-10.
4) SALVATORE M., LORIZIO R., VESCE G., POTENA A., MAGLIONE F. (1981): La tomografia assistita dal computer (TAC) nello studio del cranio del cane. Acta Medica Veterinaria *27*, 155-161.
5) LORIZIO R., SALVATORE M; POTENA A., VESCE G., DE ROSA V. (1982): Studio tomografico degli organi addominali del cane. Acta Medica Veterinaria, *28*, 57-65.
6) WORTMAN J.A. (1982): Veterinary nuclear medicine imaging. Acta Medica Veterinaria, *28*, 331-334.
7) SALVATORE M. (1982): Nuovi approcci nella diagnostica per immagini. Acta Medica Veterinaria, *28*, 335-342.
8) LORIZIO R., ARIEMMA G., SALVATORE M., POTENA A. (1982): Scintigrafia polmonare perfusionale per immagini. Acta Medica Veterinaria, *28*, 355-360.
9) VESCE G., MUTO P., SALVATORE M., LORIZIO R., POTENA A. (1982): La isotopoangiocardiografia nel cane. Acta Medica Veterinaria, *28*, 361-364.
10) LAMAGNA F., MANSI L., POTENA A., SALVATORE M. (1982): Ruolo della Medicina nucleare nello studio della perfusione miocardica nel cane. Acta Medica Veterinaria, *28*, 365-370.
11) MANSI L., PACE L., SALVATORE M., POTENA A. (1982): La tomoscintigrafia nei piccoli animali. Acta Medica Veterinaria, *28*, 371-376.
12) MUTO P., ALFANO B., SALVATORE M., LORIZIO R., POTENA A. (1982): Valutazione radioisotopica dei parametri funzionali cardiaci nel cane. Acta Medica Veterinaria, *28*, 387-394.
13) PACE L., VESCE G., SALVATORE M., LORIZIO R., POTENA A.(1982): La scintigrafia epatobiliare nei piccoli animali. Acta Medica Veterinaria, *28*, 423-429.
14) ARIEMMA G., LORIZIO R., SALVATORE M., POTENA A. (1982): La scintigrafia renale sequenziale nel cane. Acta Medica Veterinaria, 28, 431-435.
15) SALVATORE M., LORIZIO R., BRUNETTI A., CORONA A., POTENA A.(1985): La TAC del gatto in un caso di linfosarcoma. Atti SISVet, *39*, 249-251.
16) LORIZIO R., SALVATORE M., BRUNETTI A., BIANCHI L., POTENA A. (1987): Studio radiologico, tomografico e scintigrafico nella osteopatia ipertrofizzante pneumica nel cane. Atti SISVet *41*, 439-442.
17) SALVATORE M., LORIZIO R., BRUNETTI A., BELFIORE G., CORONA A., POTENA A. (1987): La tomografia computerizzata (TC) nello studio del cranio del gatto. Acta Medica Veterinaria, *33*, 139-147.
18) LORIZIO R., SALVATORE M., BIANCHI L., LAMAGNA F., POTENA A., CORONA A. (1987): Prime esperienze di scintigrafia osteo-midollare nel cane. Acta Medica Veterinaria, *33*, 149-158.
19) SALVATORE M., LORIZIO R., BRUNETTI A., BELFIORE G., CORONA A., POTENA A. (1987): Studio tomografico degli organi toraco-addominali nel gatto. Acta Medica Veterinaria, *33*, 159-168.
20) SALVATORE M., LORIZIO R., BARILE V., CORONA A., POTENA A. (1987): La risonanza magnetica nucleare (RMN): Principi teorici ed approccio alla anatomia neuroradiologica del cane. Acta Medica Veterinaria, *33*, 169-178.
21) SALVATORE M., LORIZIO R., BARILE V., CORONA A., CUOMO A., POTENA A. (1988): Studio degli organi toraco-addominali nel cane mediante tomografia e risonanza magnetica. Acta Medica Veterinaria, *34*.
22) TRENTI F. (1988) Elementi di Medicina Nucleare e Radioprotezione Veterinaria. Ediz. Esculapio,Bologna.

La S.I.S.Vet. ringrazia:

Summa, trimestrale per il Medico Veterinario, Milano
Teknofarma s.p.a. - Torino
Labometrics s.p.a. - Reagenti per immunoistochimica e immunochimica - Milano
Kontron Instruments s.p.a. - Apparecchiature ecografiche per diagnostica veterinaria - Milano
Farmaceutici Gellini s.p.a. - Aprilia
per il contributo alla realizzazione del Seminario.