



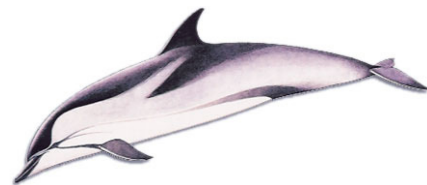
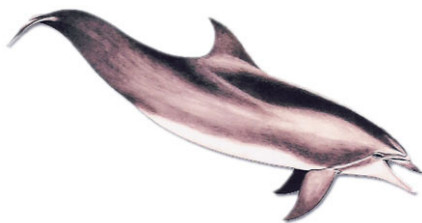
UNIVERSITÁ DEGLI STUDI DI PADOVA

FACOLTÁ DI MEDICINA VETERINARIA

Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia comparata e Igiene Veterinaria

TESI DI LAUREA

**Reperti patologici in polmoni di cetacei sia in cattività
sia a vita libera: confronto tra stenelle (*Stenella
coeruleoalba*) e tursiopi (*Tursiops truncatus*).**



Relatore:
dr. Sandro MAZZARIOL

Laureanda:
Valentina INNOCENTE

ANNO ACCADEMICO 2009-2010

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1 Morfologia esterna ed anatomia dei cetacei	2
1.2 Principali specie di odontoceti nel Mar Mediterraneo	3
1.3 Gli spiaggiamenti in Italia	4
1.4 Anatomia dei cetacei	10
1.4.1 Sfiatatoio	11
1.4.2 Sacchi aerei	12
1.4.3 Laringe e sfintere platofaringeo	13
1.4.4 Apparato ioideo	15
1.4.5 Trachea	15
1.4.6 Albero bronchiale	16
1.4.7 Polmoni	17
1.4.8 Diaframma	19
1.5 Fisiologia della respirazione	19
1.6 Principali agenti patogeni dell'apparato respiratorio negli odontoceti	20
1.6.1 I virus	21
1.6.2 I batteri	27
1.6.3 Agenti fungini	30
1.6.4 Parassiti	32
1.6.5 Varie	38
1.7 Mineralizzazioni, particolato esogeno e endogeno a livello polmonare	39
1.8 Neoplasie	40
1.9 Fisiopatologia dell'apparato respiratorio: peculiarità dei cetacei	41
1.10 Macrofagi polmonari	42
1.11 Classificazione anatomopatologica delle lesioni dell'apparato respiratorio in medicina veterinaria	45
1.11.1 Anomalia del contenuto d'aria	45
1.11.2 Disturbi circolatori del polmone	46
1.12 Classificazione delle polmoniti	49

2. SCOPO	53
3. MATERIALI E METODI	55
3.1 Individuazione dei campioni	55
3.2 Suddivisione dei soggetti in funzione delle aree marine	60
3.3 Riduzione dei preparati	62
3.4 Inclusione delle biocassette in paraffina	63
3.5 Taglio	63
3.6 Colorazione di base con ematossilina-eosina (EE) ed esame istopatologico	64
3.7 Colorazioni istochimiche specifiche	64
3.8 Valutazione macroscopica ed istopatologica ed analisi dei dati	65
3.9 Quantificazione del grado delle alterazioni istologiche prese in esame	66
4. RISULTATI	69
4.1 Grado di conservazione delle sezioni di tessuto polmonare	71
4.2 Peculiarità anatomiche	73
4.3 Aspetti macroscopici delle alterazioni polmonari	75
4.4 Valutazione istopatologica dei preparati	77
4.4.1 Alterazioni del contenuto d'aria e del circolo	77
4.5 Descrizione dei dati e dei parametri associati alla risposta infiammatoria	79
4.6 MAS	87
4.7 Pigmentazioni e mineralizzazioni	90
4.7.1 Corpora amilacea	91
4.8 Descrizione dei parametri relativi ad agente eziologico	92
4.8.1 Agenti patogeni microbici	92
4.8.2 Infestazione parassitaria	94
4.8.3 Infezioni micotiche polmonari	98

5. DISCUSSIONI	101
6. CONCLUSIONI	111
APPENDICE I - Colorazioni istochimiche	115
BIBLIOGRAFIA	125

1. INTRODUZIONE

La comparsa sulla terra dei primi mammiferi risale a circa 55 milioni di anni fa. I mammiferi, vertebrati quadrupedi discendenti dai rettili ma coperti di pelo, si distinsero per la capacità di regolare la temperatura corporea ed allattare la loro prole. Le suddette



caratteristiche e la plasticità evolutiva permisero loro di occupare diverse nicchie ecologiche; questo grazie allo spostamento dei continenti, con formazioni di aree di mare basso, particolarmente ricco di risorse alimentari e grazie all'estinzione dei grandi rettili predatori. Infatti, da un gruppo di mammiferi primitivi, i mesonchidi, (progenitori dei moderni ungulati) originarono, probabilmente, i primi

cetacei, gli archeoceti (dal greco *Arcùs*, *archeòs*, antico, e dal latino *Cetus*, cetaceo). La scomparsa degli archeoceti dal pianeta, stimata attorno ai 25 milioni di anni fa, lasciò il posto ai loro discendenti, i cetacei, distinti in due gruppi: gli odontoceti, i cetacei con i denti (dal greco *Odous*, *odontòs*, dente) ed i mysticeti, i cetacei con i fanoni (dal greco *Mystax*, *mixtacòs*, baffi o mustacchi, ai quali vagamente assomigliano i fanoni) (Notarbartolo di Sciara *et* Demma, 2004).

1.1 Morfologia esterna ed anatomia dei cetacei

I cetacei, 80 specie di cui 69 odontoceti e 11 mysticeti, sono mammiferi adattatisi ai più disparati ambienti acquatici (acque dei Poli, dell'Equatore, mare aperto, aree lagunari e perfino il corso dei grandi fiumi tropicali) grazie a numerose variazioni anatomiche e fisiologiche che ne hanno permesso la sopravvivenza anche in ambienti ostili.

Le narici, riunite in uno sfiatatoio (Yablokov *et al.*, 1974), (singolo orifizio per gli odontoceti, mantenimento del doppio orifizio per i mysticeti) sono definitivamente migrate sulla sommità del capo; il pelo è scomparso o quasi (vibrisse) ed è stato sostituito, nella sua funzione, da uno spesso pannicolo adiposo detto blubber; gli arti anteriori si sono trasformati in pinne pettorali, mentre degli arti posteriori non rimane altro che un rudimento del cinto pelvico ed eccezionalmente del femore; ai lati della coda si sono sviluppati due lobi orizzontali con funzione propulsiva; nelle specie più veloci ha preso forma la pinna dorsale, una plica cutanea irrobustita da tessuto connettivo e fibre collagene con funzione stabilizzatrice; il collo è scomparso ed il capo si è saldato al tronco tramite fusione delle vertebre cervicali subendo, inoltre, una rotazione telescopica ed una deformazione laterale che gli conferisce una marcata asimmetria (probabilmente vantaggiosa nell'uso del biosonar) (Notarbartolo di Sciara *et* Demma, 2004).

Tra tutti, appare interessante il processo evolutivo che permette a questi animali di permanere per lungo tempo immersi nell'acqua, anche ad elevate profondità, consentendo loro di cacciare e di cibarsi.

1.2 Principali specie di odontoceti nel mar mediterraneo

Il Mediterraneo è un bacino semichiuso che comunica con i mari del mondo attraverso lo stretto di Gibilterra.

La provenienza della cetofauna del Mar Mediterraneo, costituita da 19 specie osservate e nessuna di queste endemica, viene considerata prettamente atlantica (Notarbartolo di Sciara *et* Demma, 2004). A supporto di questa tesi sta il fatto che sia la diversità di specie, sia il numero di questi esemplari, diminuiscono gradualmente da Gibilterra verso levante. Ulteriori fattori quali la presenza nel Mediterraneo occidentale di cetacei che compiono migrazioni tra Oceano Atlantico e Mediterraneo attraverso lo stretto di Gibilterra e la ben nota oligotrofia del Mediterraneo orientale rispetto all'occidentale, ne spiegano la distribuzione. In particolare il Mar Ligure ed il Mar di Corsica sono le regioni in cui i cetacei sono più abbondanti.

Solo 8 delle specie mediterranee possono considerarsi regolari ed, in base alla loro preferenza di habitat, possono essere divise in tre gruppi principali: pelagiche (profondità medie superiori ai 2000 m), di scarpata profonda (tra i 1000 ed i 1500 m) e neritiche, o costiere (a profondità inferiori a 500 m). Alle specie pelagiche appartengono la balenottera comune (*Balaenoptera physalus*), lo zifio (*Ziphius cavirostris*) e la stenella striata (*Stenella coeruleoalba*); al secondo gruppo il capodoglio (*Physeter macrocephalus*) ed il grampo (*Grampus griseus*); infine al terzo gruppo appartengono il delfino comune (*Delphinus delphis*) ed il tursiope (*Tursiops truncatus*) (Notarbartolo di Sciara *et* Demma, 2004).

Tabella 1.1: suddivisione delle specie del Mar Mediterraneo in base alla preferenza di habitat

1) Pelagiche (a profondità medie superiore ai 2000 m)	<i>Balaenoptera physalus</i> (Linnaeus, 1758)
	<i>Ziphius Cavirostris</i> (Cuvier, 1823)
	<i>Stenella coeruleoalba</i> (Meyen, 1833)
2) Di scarpata profonda (tra i 1000 e i 1500 m)	<i>Physeter macrocephalus</i> (Linnaeus, 1758)
	<i>Grampus griseus</i> (Cuvier, 1821)
3) Neritiche o costiere (a profondità inferiori ai 500 m)	<i>Delphinus delphis</i> (Linnaeus, 1758)
	<i>Tursiops truncatus</i> (Montagu, 1821)

1.3 Gli spiaggiamenti in italia

Gli spiaggiamenti, ossia il reperimento di animali vivi o morti lungo la costa o in vicinanza di questa, hanno permesso lo studio delle peculiari caratteristiche dei cetacei.

In Italia, gli spiaggiamenti vengono segnalati grazie alla costante opera di istituzioni pubbliche, come il Centro Studi Cetacei e di volontari. Negli ultimi tre anni sono stati registrati, lungo le coste italiane 268 casi di spiaggiamenti (Banca dati spiaggiamenti Università di Pavia): 78 spiaggiamenti nel 2006 (30 tursiopi e 23 stenelle); 108 casi nel 2007 (33 tursiopi e 45 stenelle) e 82 casi nel 2008 (26 tursiopi e 27 stenelle).

Nello studio del 2004 di Podestà *et* Cozzi si possono osservare il numero e le specie coinvolte negli spiaggiamenti sulle coste italiane in un arco di quasi vent'anni.

Tabella 1.2: cetacei spiaggiati in Italia tra il 1986 ed il 2004, tratta da Podestà *et* Cozzi 2004

Scientific name	Common name	Number of specimens
<i>Balaenoptera physalus</i>	Fin whale	60
<i>Balaenoptera acutorostrata</i>	Minke whale	4
<i>Megaptera novaeangliae</i>	Humpback whale	1
<i>Physeter macrocephalus</i>	Sperm whale	125
<i>Kogia sima</i>	Dwarf sperm whale	2
<i>Ziphius cavirostris</i>	Cuvier's beaked whale	51
<i>Mesoplodon europaeus</i>	Gervais' beaked whale	1
<i>Pseudorca crassidens</i>	False killer whale	3
<i>Globicephala melas</i>	Long-finned pilot whale	49
<i>Grampus griseus</i>	Risso's dolphin	120
<i>Steno bredanensis</i>	Rough-toothed dolphin	6
<i>Tursiops truncatus</i>	Bottlenose dolphin	656
<i>Delphinus delphis</i>	Short-beaked common dolphin	33
<i>Stenella coeruleoalba</i>	Striped dolphin	1469
Unidentified cetaceans		761
Total		3341

Gli spiaggiamenti non hanno una distribuzione uniforme durante il corso dell'anno, infatti, si notano picchi in periodi compresi tra tarda primavera ed estate, quando vi è una più assidua presenza dell'uomo sulle coste, fatto che incrementa il numero delle segnalazioni (Podestà *et* Cozzi, 2004).

La stenella (44% degli spiaggiamenti totali) e il tursiopo (20%) sono le due specie più soggette al fenomeno dello spiaggiamento.

Per un approccio adeguato alle cause di spiaggiamento è innanzitutto necessario distinguere tra spiaggiamenti di massa ed individuali; nei primi sono coinvolte

soprattutto specie pelagiche, strettamente gregarie o poco abituate alle acque interne (Geraci *et al.*, 1993).

Le cause che portano questi animali a spiaggiarsi sono in gran parte sconosciute (Evans, 2005).

La Tabella 1.3 riassume alcune cause di spiaggiamento estrapolate dallo studio di 111 soggetti (109 odontoceti, di cui 49 stenelle e 41 tursiopi, e 2 mysticeti) trovati spiaggiati tra il 1995 e il 2005 sulle coste italiane; importante sottolineare che, però, non vengono prese in considerazione le morti indotte da immunosoppressione da tossici ambientali come organo clorurati (PCBs, 4-4'DDE, etc.) e metalli pesanti (Hg, Pb, Cd, etc) e che non si è potuta stabilire la causa di morte nel 30% dei soggetti esaminati. Per i soggetti rimanenti (70%) si stima che la morte sia avvenuta per cause naturali nel 53% dei casi e per fattori antropogenici (collisione con navi o pescherecci e intrappolamento nelle reti da pesca) nel 17% (Di Guardo *et al.*, 2005).

Tabella 1.3 – tratta da Human-Induced Mortality in Cetaceans Found Stranded on the Italian Coastline (1995-2005)

Table 1: Number of stranded cetaceans (n=111) included in the survey, grouped in relation to their general (HIM factors, natural causes, unknown causes) and specific causes of death.

General cause of death	Specific cause of death								Total (%)
	<i>Collision with ships or boats</i>		<i>Entanglement in fishing gears</i>		<i>Direct killing</i>			<i>Foreign body ingestion</i>	
HIM factors									19 (17%)
	9		7		2			1	
Natural causes	<i>Pneumonia</i>	<i>Encephalitis</i>	<i>Septicemia</i>	<i>Enteritis</i>	<i>Hepatitis</i>	<i>Heart failure</i>	<i>Kidney failure</i>	<i>Pancreatitis</i>	59 (53%)
	27	14	5	3	3	3	2	2	
Unknown causes	33								33 (30%)

HIM factors = human-induced mortality factors

Le crescenti indagini effettuate sui cetacei spiaggiati (Di Guardo *et al.*, 2005) dimostrano che l'apparato respiratorio è quello maggiormente colpito da patologie spontanee, soprattutto nei cetacei di piccole dimensioni. Si è ritenuto, quindi, interessante approfondire questo aspetto comparando i reperti sia tra le due specie di odontoceti maggiormente rappresentate nei nostri mari (*Tursiops truncatus* e *Stenella coeruleoalba*), sia tra tursiopi a vita libera e quelli in cattività. Di seguito riportiamo alcune note che descrivono sommariamente le loro caratteristiche biologiche.

Stenella striata (*Stenella coeruleoalba*)



Figura 1.1: stenella striata

- Tassonomia

Classe: Mammiferi

Ordine: Cetacei

Sottordine: Odontoceti

Famiglia: Delphinidae

- Descrizione

Delfino di piccola mole, lungo circa 2 metri e 100 Kg di peso medio; livrea costituita da striature nere sul dorso, grigie sui fianchi e bianche sul ventre, corporatura slanciata ed elegante. E' un cetaceo gregario, vive in genere in gruppi di 20-30 esemplari in acque tipicamente pelagiche. (Cagnolaro *et al.*, 1983; Perrin *et al.*, 1994; Notarbartolo di Sciara *et Demma*, 2004)

- Nuoto

Le capacità di immersione della stenella non sono mai state misurate, ma dal ritrovamento nel suo stomaco di prede mesopelagiche, si suppone che sia in grado di raggiungere profondità di almeno alcune centinaia di metri (Notarbartolo di Sciara *et Demma*, 2004).

- Habitat

La stenella striata è un delfino cosmopolita, predilige acque pelagiche profonde (di poco inferiori a 1900 metri), ma la si può incontrare anche a qualche miglio dalla costa della piattaforma continentale. La temperatura dell'acqua non rappresenta un fattore limitante; può essere osservato sia in acque tropicali, sia temperate o temperato-fredde (Cagnolaro *et al.*, 1983; Perrin *et al.*, 1994; Notarbartolo di Sciara *et Demma*, 2004).

- Alimentazione

La stenella si ciba di una notevole varietà di prede a seconda delle circostanze e della disponibilità; la sua dieta comprende: cefalopodi, pesci ossei e crostacei macroplanktonici. In Mediterraneo, la base alimentare della stenella striata è rappresentata dai cefalopodi e di questi il totano (*Todarodes sagittatus*) è la specie preferita. I pesci ossei, quando presenti negli stomaci, lo sono in grande quantità; si tratta spesso di pesci mesopelagici come il potassolo (*Micromesistius potassou*), il nasello (*Merluccius merluccius*), il Chauliodus sloanei, varie specie di mictofidi, ma anche di piccoli gregari come l'acciuga (*Engraulis encrasicolus*). I crostacei predati, soprattutto nel Mar Ligure, appartengono alla specie *Pasiphaea multidentata* che vive in genere tra i 500 e i 700 m di profondità (Wurtz *et Marrale*, 1993; Perrin *et al.*, 1994; Notarbartolo di Sciara *et Demma*, 2004).

- Distribuzione mediterranea

Ad oggi la stenella, pur essendo sempre stata presente nei nostri mari, ha sostituito il delfino comune (*Delphinus delphis*) nel ruolo di delfinide pelagico più abbondante nel Mediterraneo. Molto abbondante nella porzione occidentale e centrale del Mediterraneo, la sua frequenza diminuisce verso oriente. E' il cetaceo più frequente nel Mar Ligure, nel Tirreno, Mar di Sardegna, nello Ionio e nel basso Adriatico; cedendo il posto al tursiope nell'Adriatico settentrionale e nel Canale di Sicilia (bassi fondali marini) (Notarbartolo di Sciara *et Demma*, 2004).



Figura 1.2: distribuzione mediterranea delle stenelle

- Spiaggiamenti

La stenella viene spesso trovata spiaggiata, ma sempre individualmente. In Italia è la specie che spiaggia più frequentemente anche per la sua netta predominanza numerica su tutte le altre specie di cetacei pelagici nei nostri mari.

Tursiope (*Tursiops truncatus*)

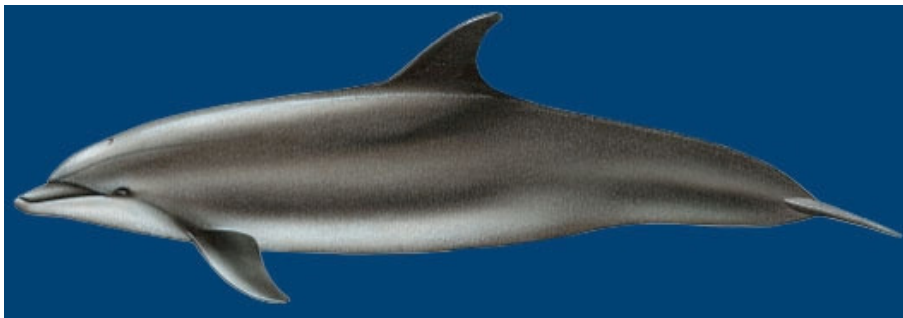


Figura 1.3: tursiope

- Tassonomia

Classe: Mammiferi

Ordine: Cetacei

Sottordine: Odontoceti

Famiglia: Delphinidae

- Descrizione

E' un delfino di grande mole, la lunghezza media è di 2,5-3,5 metri, con un peso che varia dai 270 ai 350 Kg; la livrea del tursiope ha una colorazione sfumata, poco definita e variabile da soggetto a soggetto. Presenta color grigio più scuro sul dorso che sui fianchi, di corporatura alquanto tozza, con pinna dorsale piuttosto alta e falcata. E' un cetaceo di abitudini costiere, si incontra in gruppi in genere inferiori alla decina.

Nuoto: quando nuota in superficie, in condizioni di normale trasferimento, riemerge per respirare ogni 15-20 secondi; può immergersi fino a 600 metri per un tempo massimo di 13-15 minuti, nonostante gran parte delle sue prede si trovino più vicine alla superficie (Cagnolaro *et al.*, 1983; Randall *et Scott*, 2002; Notarbartolo di Sciara *et Demma*, 2004).

- Habitat

E' una delle specie di cetacei che maggiormente si adatta ai diversi habitat ma predilige l'ambiente costiero e soprattutto acque basse, limacciose e calme di lagune, canali, estuari e atolli, ma anche le coste rocciose. Il tursiope predilige le acque tropicali, subtropicali e temperate del mondo.

Nel Mediterraneo l'ecotipo prevalente è quello costiero, la profondità media del mare nelle località di avvistamento non supera i 100 m.

- Alimentazione

Il tursiope è principalmente ittiofago, ma è capace di adattare la sua dieta alla preda più facilmente ottenibile come calamari, polpi, seppie, crostacei e altri invertebrati, arrivando anche ad avvantaggiarsi dell'attività di pesca dell'uomo cibandosi degli scarti della pesca o sottraendo il pesce dalle reti (Cagnolaro *et al.*, 1983; Blanco *et al.*, 2001; Notarbartolo di Sciara *et Demma*, 2004).

- Distribuzione mediterranea

Il tursiope è presente in tutto il Mediterraneo ed è considerata la specie più diffusa e, ad eccezione del profondo bacino ligure-provenzale, lo si può avvistare nei pressi della costa della Riviera ligure di Levante, nell'Arcipelago Toscano, lungo la costa

tirrenica della penisola e nelle acque costiere di Corsica, Sardegna e Sicilia. Risulta la specie di cetaceo più frequentemente avvistata nel Canale di Sicilia, Isole Pelagie; meno frequentemente lungo la costa ionica di Calabria, Basilicata e Puglia e, man mano che si risale verso nord, il Mare Adriatico, il tursiope diviene l'unica specie di cetacei comunemente avvistabile (Cagnolaro *et al.*, 1983; Randall et Scott, 2002; Notarbartolo di Sciara *et Demma*, 2004).

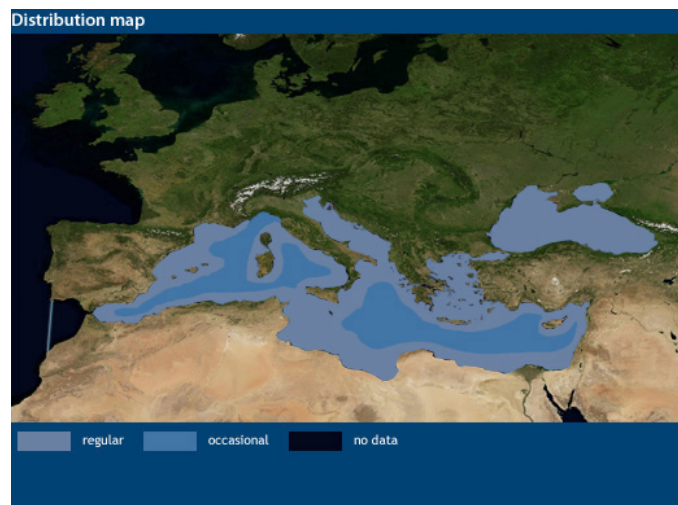


Figura 1.4: distribuzione mediterranea dei tursiope

- Spiaggiamenti

Data la dimestichezza con l'ambiente costiero, il tursiope non è particolarmente soggetto ai grandi spiaggiamenti di gruppo e, per lo stesso motivo, è particolarmente vulnerabile all'inquinamento, soprattutto in forme di intossicazione cronica (Adriatico). (Notarbartolo di Sciara *et Demma*, 2004).

1.4 Anatomia dei cetacei

I cetacei hanno sviluppato, durante la loro evoluzione, numerosi adattamenti anatomici e fisiologici che permettono la vita libera in ambiente marino, a partire dalla stessa forma del corpo che si presenta affusolato per permettere una maggior penetrazione nel mezzo in cui si muovono, alle modificazioni scheletriche, che hanno portato all'assenza di arti

posteriori, ad esclusione di ossa rudimenti pelvici vestigiali, alla presenza di pinne pettorali, corrispondenti agli arti toracici e caratterizzate da polidattilia e polifalanga, alla telescopica del cranio, con la formazione del rostro per la predazione in acqua e lo spostamento delle narici sulla sommità del capo. Da sottolineare ancora le modificazioni del tegumento, con l'assenza di annessi come la pelliccia e lo sviluppo di uno strato di tessuto fibroadiposo noto come blubber, al fine di ottenere un minor attrito ed un maggior isolamento termico. Essendo mammiferi che vivono in acqua, anche l'apparato respiratorio ha subito delle notevoli modificazioni anatomiche (Cozzi *et al.*, 2005)

Il sistema respiratorio viene funzionalmente suddiviso in tre porzioni:

- Il sistema di conduzione include cavità nasali, seni, laringe, trachea e bronchi.
- Il sistema di transizione è costituito dai bronchioli e comprende anche quelli respiratori.
- Il sistema di scambio è composto dagli alveoli.

1.4.1 Sfiatatoio

Lo sfiatatoio (figura 1.5) è l'organo respiratorio dei cetacei con funzione simile alle narici da cui prende origine e con cui è quindi omologo. E' posizionato sulla sommità del capo per permettere all'animale di poter meglio respirare quando si trova in superficie (Yablokov *et al.*, 1974).

Lo sfiatatoio, o plug, ha in genere forma semilunare e concavità craniale. La sua chiusura durante l'immersione è garantita da un cuscinetto costituito da tessuto adiposo e connettivo fibroso, che viene mantenuto in situ dalla pressione dell'acqua; al momento della respirazione in superficie, invece, la sua apertura è governata da un controllo muscolare (Yablokov *et al.*, 1974).

Lo sfiatatoio ed i seni nasali sono collegati direttamente alla trachea all'altezza della faringe, ma non all'esofago come avviene negli altri mammiferi terrestri, grazie ad una particolare modificazione della laringe. Per questo motivo non esiste il rischio che il cibo finisca accidentalmente nelle vie aeree, provocando il soffocamento (Reidenberg *et Laitman*, 1987; Reidenberg *et Laitman*, 1994). La forma e la posizione variano da specie a specie e spesso assumono valore sistematico (MacLeod *et al.*, 2007; Reidenberg *et Laitman*,

1987). Negli odontoceti, le due cavità nasali sono separate nella parte profonda del cranio, per poi fondersi nel tragitto verso la sommità in una sola apertura nasale, oppure una di esse permane non funzionante ed esaurisce la propria corsa prima di aprirsi all'esterno (Notarbartolo di Sciara *et* Demma, 2004).

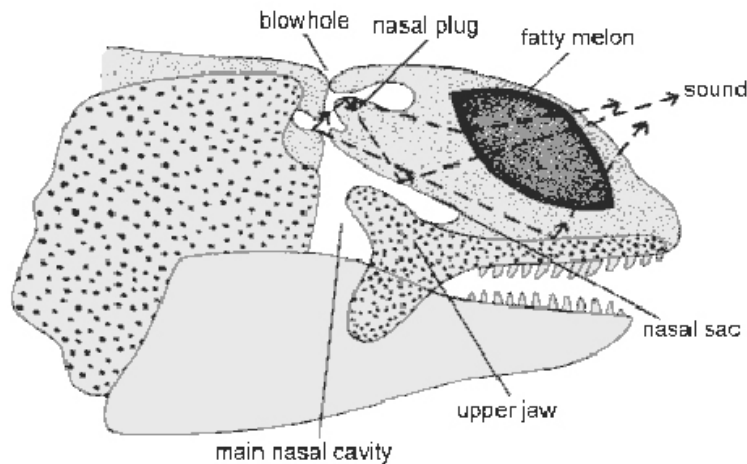


Figura 1.5: sfiatatoio e sacchi aerei dei cetacei

1.4.2 Sacchi aerei

I sacchi paranasali (Fig. 1.5) si localizzano ai lati dei due condotti nasali. Un condotto tubulare crea un legame tra questi sacchi e un nuovo pacchetto, chiamato sacco premascellare. Ad un livello più basso i condotti nasali si fonderanno per concludersi nelle coane, dove si trova la laringe, tenuta in sede mediante uno sfintere. Troviamo quindi tre livelli di chiusura verso l'esterno: lo sfiatatoio, i due condotti nasali ed, infine, lo sfintere perilaringeo.

Nei cetacei l'assenza dei seni paranasali e la loro sostituzione con sacchi aerei è attribuibile all'adattamento per l'immersione. A differenza dei seni, camere aeree incluse nelle ossa craniche e quindi circondate da pareti rigide che non permetterebbero un accomodamento alle variazioni di pressioni dovute all'immersione, i sacchi aerei, derivando da un'invaginazione del tegumento, sono dotati di pareti flessibili (diverticoli extracraniali) e annullano così il rischio di fratture (Reidenberg *et* Laitman, 2008).

Il sistema dei sacchi aerei dei cetacei può essere paragonato anatomicamente e funzionalmente con quello dei seni paranasali dei mammiferi terrestri, pur non essendo omologhi. I sacchi aerei sono implicati negli scambi gassosi (Yablokov *et al.*, 1974), nella termoregolazione,

risonanza e nella pneumatizzazione del cranio (Reidenberg *et al.* Laitman, 2008). I sacchi aerei aumentano il volume dell'aria inspirata, attenuano le variazioni volumetriche indotte dai cambi di pressione, promuovono lo smistamento dell'aria per ridurre gli spazi morti respiratori e facilitano la produzione e la trasmissione del suono sott'acqua. (Reidenberg *et al.* Laitman, 2008).

Un paio di sacchi pterigoidei, posti nella regione ventrale del cranio, connettono la faringe alle cavità dell'orecchio medio.

1.4.3 Laringe e sfintere palatofaringeo



Figura 1.6: laringe e sfintere palatofaringeo

La laringe è una struttura a forma di becco d'oca (Fig. 1.6) che si proietta in direzione dorso-craniale dal pavimento della faringe (Reidenberg *et al.* Laitman, 1987; Reidenberg *et al.* Laitman, 1988; Smith *et al.*, 1999). E' formata da un'epiglottide allungata e da cartilagine curviculata; si estende attraverso una piccola apertura nell'esofago, supportata lateralmente da una cartilagine tiroidea allargata, fino al passaggio relativamente verticale delle coane (Reidenberg *et al.* Laitman, 1987).

Mentre la laringe della maggior parte dei mammiferi terrestri è separabile dal nasofaringe, quella degli Odontoceti è costantemente mantenuta in posizione all'interno delle coane dallo sfintere palato faringeo (Yablokov *et al.*, 1974; Reidenberg *et al.* Laitman, 1987)

La laringe e l'apparato ioideo ad essa associato hanno subito uno spostamento verso sinistra per permettere un allargamento del seno piriforme di destra (canale alimentare faringeo

laterale) al fine di rendere possibile l'ingestione di prede di taglia maggiore (Reidenberg *et* Laitman, 1994). I risultati di C.D. Macleod *et al.* (2007) forniscono un supporto all'ipotesi che l'asimmetria direzionale che si riscontra nel cranio degli odontoceti sia relazionata ad un adattamento acquatico che consente l'ingestione di grandi prede intere, pur mantenendo la protezione del tratto respiratorio. In odontoceti in libertà sono stati occasionalmente registrati casi di asfissia risultante dalla dislocazione della laringe (Siebert *et al.*, 2001).

Il livello di asimmetria della laringe nelle diverse specie di odontoceti dipende dalla pressione selettiva determinata dalla taglia della preda preferenziale.

Reidenberg *et* Laitman (1987) affermano: "Il tratto respiratorio più craniale degli odontoceti si è evoluto a partire da un modello respiratorio di base per tutti i mammiferi. La posizione della laringe nei mammiferi terrestri, di solito, corrisponde alle vertebre cervicali C1 C3. La laringe degli odontoceti è posta rostralmente al livello dell'atlante e si estende fino alla sincondrosi presfenoidale. La sua estensione sopra il livello del forame magno è dovuto a tre fattori: 1) la laringe si allunga attraverso un'estensione tubulare che si proietta caudalmente al palato molle fino al nasofaringe; 2) la regione del collo è corta a causa del forte grado di compressione delle vertebre cervicali; 3) la base del cranio è orientata nella stessa direzione delle vertebre cervicali a causa dell'allineamento orizzontale e fusiforme di testa e torace. La posizione della laringe probabilmente influenza le capacità vocali, permettendo loro di cacciare ed ecolocalizzare simultaneamente".

Microscopicamente, a livello laringeo, si possono osservare ghiandole mucose poste tra l'epitelio e la sottostante cartilagine; la laringe segna, inoltre, il passaggio da un epitelio squamoso ad uno colonnare pseudostratificato ciliato che poggia su uno strato di cellule cuboidali e su una sottile membrana basale (Ridgway, 1972).

A livello di mucosa laringea rostro-ventrale, ventralmente all'apertura della cartilagine cricoide, si incontra una grande ghiandola linfoepiteliale, la tonsilla laringea, individuata nella maggior parte, se non in tutte, le specie di odontoceti, sequela della divisione tra tratto respiratorio e digerente in queste specie (Reidenberg *et* Laitman, 1988); (Cowan *et* Smith, 1999; Beineke *et al.*, 2009) Si presenta come un'area trabecolata elevata, con margini ben definiti. Istologicamente si individua un epitelio colonnare pseudostratificato con interdigitazioni nella sottomucosa; le pliche e le cripte epiteliali sono circondate da

aggregati linfoidi, spesso associati a ghiandole mucose, che infiltrano l'epitelio (Cowan et Smith, 1999). La tonsilla laringea rappresenta sia il primo filtro meccanico che separa l'aria inspirata dagli antigeni e dal particolato esogeno (Cowan et Smith, 1999), sia la responsabile della presentazione degli antigeni durante l'inalazione (Beineke et al., 2009).

1.4.4 Apparato ioideo

Gli odontoceti sono dotati di un robusto apparato ioideo considerato il punto principale di attacco di molti muscoli e legamenti coinvolti nella respirazione, nella predazione e nella produzione dei suoni (Reidenberg et Laitman, 1994; Geraci et Lounsbury, 1993).

Come quello dei loro più prossimi parenti terrestri, gli artiodattili, l'apparato ioideo è composto da una porzione basale (basiiale, coppia tiroiale) e una porzione sospensoria (coppia di cheratoiali, epiiali, stiloiali, timpanoiali) che connettono la porzione basale alla base cranica (Reidenberg et Laitman, 1994)

A differenza dei mammiferi terrestri, la sua porzione basale giace inferiormente all'adito laringeo ed è appiattita dorso-ventralmente e relativamente larga, fornendo un'ampia superficie di attacco per la muscolatura. Gli elementi sospensori non sono così appiattiti e sono connessi da articolazioni sinoviali (ad eccezione della fusione epiiale-stiloiale) (Reidenberg et Laitman, 1994).

La specializzazione muscolare coinvolge i muscoli sterno-ioidei, responsabili della retrazione dell'apparato ioideo, stiloglosso ed ioglosso, responsabili del controllo della lingua. Questi muscoli rivestono un ruolo importante sia in un particolare comportamento di predazione chiamato suction feeding (simultanea suzione e deglutizione), sia nella produzione dei suoni.

1.4.5 Trachea

La trachea degli odontoceti è corta e robusta, tale da garantire un ricambio d'aria rapido e completo (Ridgway, 1972). E' sostenuta da numerosi e possenti anelli tracheali semicompleti che hanno andamento spirale lungo l'asse dell'organo e la cui estremità dorsale libera si sovrappone a quella adiacente formando, di fatto, una struttura tubulare (Yablokov et al., 1974; Fanning et Harrison, 1974; B.Cozzi et al, 2005; Yablokov et al.,

1974). La superficie interna è rivestita da epitelio pseudostratificato colonnare ciliato; nella sottomucosa si osservano scarse cellule linfocitarie; al contrario degli altri mammiferi, le cellule caliciformi mucipare sono assenti (Ridgway, 1972). Lungo la superficie interna degli anelli cartilaginei sono disseminate numerose lacune venose (figura 1.7) inserite in una matrice di tessuto connettivo; queste riempiendosi velocemente di sangue, evitano i danni da aumento di pressione e permettono un immediato ritorno alla forma originale, annullando il rischio di piegamento o rottura della trachea; questo particolare tessuto viene descritto in stenelle (Cozzi *et al.*, 2005) e nei tursiopi (Fanning *et Harrison*, 1974).

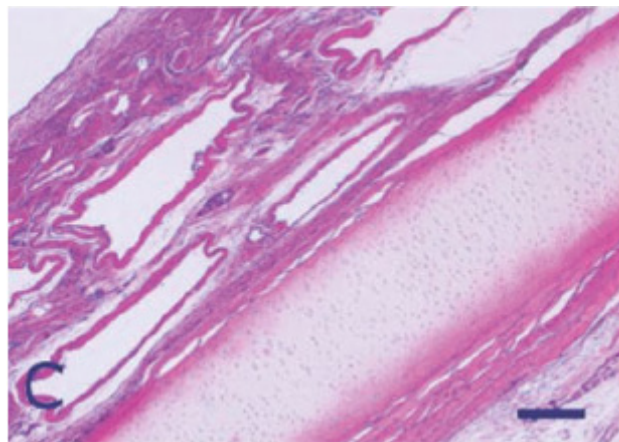


Figura 1.7: lacune venose nello spessore della mucosa bronchiale. Tratto da (Cozzi *et al.*, 2005).

1.4.6 Albero bronchiale

In tutta la loro estensione i bronchi sono forniti di robusti anelli cartilaginei che, assieme alle lacune venose, presenti solo nei bronchi prossimali (Ridgway, 1972), impediscono il collasso dell'albero bronchiale a grandi profondità.

La struttura anatomica microscopica bronchiale è sovrapponibile a quella tracheale: la mucosa è rivestita da cilia e non si rileva la presenza di cellule mucipare.

L'individuazione di ghiandole mucose può essere considerata un evento inusuale. Il BALT (*Bronchial associated lymphoid tissue*) nei cetacei è costituito da aggregati linfoidi disseminati e solo eccezionalmente organizzati in noduli (Ridgway, 1972; MacLeod *et al.*, 2007).

Nella parete bronchiale troviamo due distinti fasci di fibre elastiche orientate longitudinalmente: una dietro allo strato della mucosa, l'altra che circonda e pone in

connessione le cartilagini bronchiali; si può osservare, inoltre, la scarsa presenza di fibre di muscolatura liscia circolare.

Nei bronchioli terminali dei piccoli cetacei, distinti fasci mioelastici circolari si organizzano a formare nuove strutture, dette sfinteri mioelastici, disposte a brevi intervalli tra anelli di cartilagine successivi e in grado di dividere i bronchioli terminali in una serie di compartimenti (Ridgway, 1972). La funzione di tali sfinteri è quella di imprigionare l'aria a livello dell'epitelio respiratorio durante le immersioni (Boshier, 1974; Bortolotto, 1992; Wessels *et* Chase, 1998); infatti, la pressione che in immersione viene esercitata sulla gabbia toracica, spingerebbe l'aria all'interno dell'albero bronchiale, andando così a costituire un voluminoso, quanto inutile, volume morto.

La mucosa dei bronchioli più distali è formata da un singolo strato di piccole cellule cuboidali senza muco e cilia; man mano che l'epitelio della mucosa si appiattisce si giunge al cosiddetto bronchiolo respiratorio, che non partecipa agli scambi respiratori, non essendo a stretto contatto con strutture capillari (Ridgway, 1972).

1.4.7 Polmoni

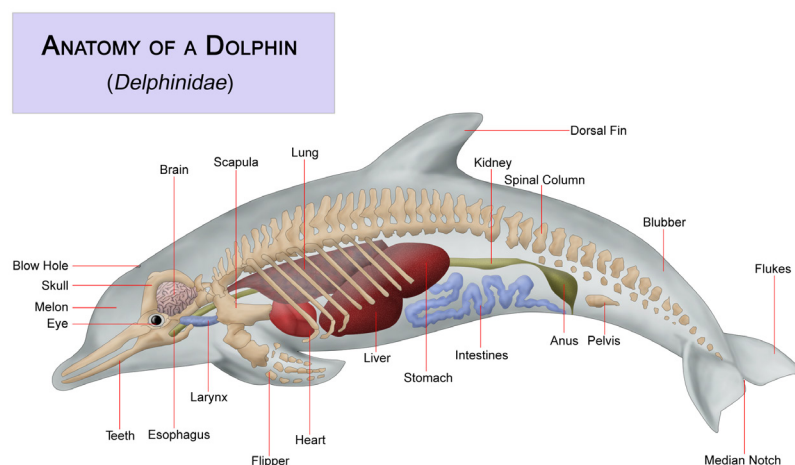


Figura 1.8: anatomia degli odontoceti Cetacean Palaeobiology – University of Bristol – Department of heart sciences.

I polmoni dei Cetacei sono allungati, di forma sacculata e situati dorsalmente nel torace. Sono scarsamente lobulati e occasionalmente si rinviene la presenza di un lobo apicale

destro (odontoceti). In particolare Nakakuki (1994) descrive, nei polmoni di *Stenella coeruleoalba*, la presenza di un lobo craniale e uno caudale, fusi assieme.

La porzione cranio-ventrale del polmone sinistro dei tursiopi e di altri piccoli odontoceti è talvolta molto sottile, simile ad un velo, nel punto in cui ricopre il cuore (Rommel *et Lowenstine*, 2001).

Alla palpazione i polmoni si presentano compatti ed elastici, per la presenza di anelli cartilaginei che si estendono dalla trachea fino alle giunzioni con i sacchi alveolari (Ridgway, 1972).

Il volume dei polmoni dei mammiferi marini dipende dall'efficienza di immersione di ogni specie. Mammiferi marini che compiono immersioni profonde e prolungate tendono ad avere polmoni più piccoli di quanto ci si aspetterebbe, mentre, al contrario, quelli che si immergono a basse profondità, tendono ad averli più grandi (Pabst *et al.*, 1999; Yablokov *et al.*, 1974).

Il volume respiratorio e la capacità polmonare variano notevolmente nelle diverse specie degli odontoceti; nel tursiope, ad esempio, il volume respiratorio oscilla tra 49 e 71 ml/Kg, mentre la capacità polmonare è di 5-7 litri (Yablokov *et al.*, 1974).

La configurazione della ramificazione delle vie aeree terminali negli alveoli varia tra i mammiferi marini ma, in genere, il parenchima funzionale è costituito da sacchi aerei formati da 10-20 alveoli allungati. La parete alveolare è formata da pneumociti di tipo I, detti di membrana che, assieme all'endotelio capillare e membrana basale, formano la barriera aria-sangue e da pneumociti di tipo II, granulari, cellule cuboidali che producono surfactante. Quest'ultimo previene il collasso alveolare durante la respirazione, abbassando la tensione superficiale.

I pneumociti di I tipo sono molto sottili e molto soggetti agli insulti; quelli necrotici vengono sostituiti con pneumociti di tipo II che si differenzieranno in tipo I.

Il numero delle unità dei dotti alveolari per lobulo varia con la specie. I setti interalveolari, con spessore medio di 10-20 μ , hanno una doppia fila di capillari nella maggior parte dei cetacei e, negli odontoceti, le loro estremità libere sono dotate di singole fibre elastiche organizzate a formare un nodo (Ridgway, 1972). Infine, il sistema linfatico polmonare appare molto sviluppato e rimuove costantemente fluidi in eccesso dall'organo.

1.4.8 Diaframma

Il diaframma si inserisce più obliquamente rispetto a quanto avviene nei mammiferi terrestri, garantendo la massima espandibilità dei polmoni (Bryden, 1986).

1.5 Fisiologia della respirazione

Gli atti di inspirazione ed espirazione dei cetacei sono molto rapidi; negli odontoceti avvengono, infatti, in un arco di tempo compreso tra gli 0.3 e gli 0.4 secondi.

I ritmi respiratori variano in funzione della specie in esame e della profondità di immersione; 3-8 atti inspirazione-espirazione/minuto in caso di immersioni profonde e 1-6/minuto quando si tratta di un semplice spostamento in superficie (Yablokov *et al.*, 1974).

Inoltre, la frequenza degli atti respiratori cambia in funzione della velocità di spostamento in superficie, variando tra 6-12 atti/minuto (alta velocità) a 0.5-1 atti/minuto (a riposo).

L'espirazione è un'azione volontaria, controllata direttamente dal sistema nervoso centrale, mentre l'inspirazione avviene per il rilassamento dei muscoli toracici e del diaframma. Durante l'immersione una piccola percentuale di aria viene lentamente eliminata attraverso lo sfintere palato-faringeo. La ventilazione e la respirazione dei cetacei sono molto efficienti, infatti, ad ogni respiro il ricambio del volume polmonare raggiunge l'80-90% (contro un 15% dell'uomo); a fine immersione, l'ossigeno può raggiungere l'1.5% dei gas espirati (Slijper *et al.*, 1979).

Durante l'immersione l'animale si trova a dover affrontare problemi correlati alla mancanza di ossigeno e all'aumento di pressione.

Per sopperire alla necessità di respirare in superficie e nutrirsi in immersione (grazie alla chiusura dello sfintere palato-faringeo), i cetacei hanno affinato una serie di adattamenti fisiologici ed anatomici.

L'alta densità di mioglobina nei muscoli rappresenta la caratteristica peculiare degli animali che si immergono a grandi profondità. Il prolungamento del tempo di apnea è reso possibile anche dall'alta percentuale di emoglobina nel sangue, dall'aumento del volume sanguigno e dall'ipometabolismo. (Kooyman, 1973; Kooyman *et Ponganis*, 1998; Fahlman

et al., 2006; Perrin *et al.*, 2008)

Per far fronte ai problemi legati alla pressione questi animali marini hanno subito diversi adattamenti: una trachea rigida dotata di tessuto erettile (lacune venose descritte nel paragrafo) che la rende particolarmente elastica, deformabile e capace di sopportare grandi forze compressive (Cozzi *et al.*, 2005); un minor numero di vere coste; uno sterno molto corto, segmentato, mobile e resistente alle compressioni (Yablokov *et al.*, 1974); una riduzione degli spazi aerei ossei (seni facciali); una complessa rete di seni vascolari che ricopre le pareti della cavità dell'orecchio medio; un rinforzo cartilagineo e muscolare delle vie aeree periferiche; alveoli caratterizzati da grande compliance, la perdita dei bronchioli respiratori e la presenza di una serie di sfinteri mioelastici bronchiali allo sbocco nei sacchi alveolari (Perrin *et al.*, 2008). La chiusura di questi ultimi impedisce la fuoriuscita di aria dai segmenti respiratori verso i bronchi, permettendo all'animale di rimanere in una condizione di aerobiosi fino alla profondità di 70 metri (Yablokov *et al.*, 1974; Bostrom *et al.*, 2008); superata questa profondità, la funzione polmonare, ovvero il passaggio di gas dall'alveolo al sangue, diminuisce fino a cessare per il collasso degli alveoli; questo, assieme agli adattamenti cardiovascolari nelle fasi discendenti e ascendenti dell'immersione (Fahlman *et al.*, 2006), impedisce il passaggio di gas dagli alveoli al sangue; in tal modo, l'elevata pressione parziale di azoto presente nelle vie aeree non trova corrispondenza nel circolo sanguigno (Perrin *et al.*, 2008; Boyd, 1975; Bostrom *et al.*, 2008; Kooyman *et Ponganis*, 2008). La mancanza di scambi gassosi evita, quindi, l'instaurarsi di sindromi come la narcosi da azoto e la tossicità da ossigeno (Perrin *et al.*, 2008).

Il fatto di esalare l'aria prima di inalarla permette di riportare l'azoto al suo stato normale e di essere eliminato dalle vie respiratorie.

1.6 Principali agenti patogeni dell'apparato respiratorio negli odontoceti.

I disordini polmonari causati da infezioni batteriche primarie, o secondarie a gravi infestazioni parassitarie (Lawrence *et al.*, 2001), sono una patologia alquanto frequente nei cetacei, soprattutto in quelli di dimensioni minori: batteri gram negativi letali (endotossiemia) sono

stati isolati in casi di setticemia in mammiferi marini; i principali agenti eziologici sono: *Vibrio sp.*, *Edwardsiella sp.*, *Aeromonas sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Pasteurella sp.*, *Klebsiella sp.* e *Salmonella sp.* (Kennedy *et Stoskopf*, 2001; Kawashima *et al.*, 2004). I polmoni sono l'organo più colpito nei cetacei da patologie di origine virale che sono responsabili di morti acute e sono causa di mortalità stagionale ripetuta (Kennedy *et Stoskopf*, 2001). E' frequente il reperimento di patogeni occasionali, come funghi o protozoi, che interessano le vie respiratorie, soprattutto in condizioni di immunodepressione e che possono portare al decesso il soggetto colpito. L'infezione micotica più frequentemente riscontrata nei mammiferi marini è l'aspergillosi polmonare; il maggior numero di casi è stato segnalato in tursiopi in associazione ad infezione da morbillivirus (Reidarson *et al.*, 2001). Sono infine frequentissime le infestazioni parassitarie, generalmente da nematodi, che possono interessare sia le vie aeree sia il parenchima polmonare.

Anche nello studio condotto da Mazzariol *et al.* del 2007, sui cetacei spiaggiati sulle coste adriatiche, si sottolinea quanto la polmonite sia una tra le patologie più comunemente riscontrate; tutti i 14 soggetti esaminati presentavano reperti patologici di origine infiammatoria nel polmone e 12 di questi erano associati a parassitosi (Mazzariol *et al.*, 2007). La maggior parte di questi animali presentavano broncopolmonite cronica spesso associate a lesioni parassitarie come calcificazioni bronchiali e granulomi subpleurici.

Raramente si sono riscontrate lesioni polmonari non associate a nematodi: è stata descritta una polmonite uremica in un tursiope e un neonato di *Grampus griseus* che presentava lesioni infiammatorie non associate, però, ad un agente eziologico.

1.6.1 Virus

Morbillivirus (MV): l'interesse scientifico per la patologia dei mammiferi acquatici è notevolmente cresciuto a seguito dell'identificazione, dal 1987-88 in avanti, di una serie di nuovi agenti virali appartenenti al genere *Morbillivirus* (*Fam. Paramyxoviridae*). Sono virus a RNA monocatenario, dotati di envelope, sierologicamente correlati tra loro e privi di attività neuroaminidasica.

Fino al 1988 era stato dimostrato che solo quattro di essi erano in grado di sostenere gravi infezioni in numerose specie di mammiferi terrestri: il *rinderpest virus* (RPV), *peste des*

petits ruminants virus (PPRV), *measles virus* (MV) ed il virus del cimurro canino (CDV) (Kennedy *et Stoskopf*, 2001).

Dal 1988 il morbillivirus è emerso come patogeno significativo della vita selvatica dei cetacei (Swart *et al.*, 1995, Morimitsu *et al.*, 1987) ed implicato in otto infezioni che, ad oggi, hanno provocato importanti epidemie ad alta mortalità nei mammiferi marini di tutto il mondo (Kennedy, 1998; Di Guardo, 2005).

Proprio attraverso lo studio di tali eventi epidemici sono stati individuati due morbillivirus capaci di infettare i cetacei, appartenenti alla stessa specie virale *cetacean morbillivirus* (CMV) (Di Guardo *et al.*, 2005), *il porpoises morbillivirus*, PMV (Visser *et al.*, 1993; Kennedy, 1998) e il *dolphin morbillivirus*, DMV (Domingo *et al.*, 1995; Kennedy, 1998; Van Bresseem *et al.*, 2001; Jepson *et al.*, 2000).

PMV è stato isolato per la prima volta da una focena (*Phocoena phocoena*) spiaggiata e trovata morta sulle coste Irlandesi (Europa settentrionale) nel 1988 durante un'epidemia di phocine distemper virus, PDV (Kennedy, 1998; Nielsen *et al.*, 2008; Morimitsu *et al.*, 1987; Jepson *et al.*, 2000).

DMV venne identificato per la prima volta in stenelle nel Mar Mediterraneo tra il 1990-1992 (Visser *et al.*, 1993; Nielsen *et al.*, 2008; Kennedy, 1998; Raga *et al.*, 2008). Studi su questa epidemia hanno evidenziato che solo i soggetti adulti risultavano protetti da anticorpi anti DMV e che la siero-positività ha subito un graduale decremento tra il 1990 e il 1992 (dal 100% al 50%). Questi dati suggeriscono che l'infezione non è endemica in questa popolazione; i cetacei stavano perdendo la loro immunità umorale e, quindi, potevano essere suscettibili a una nuova epidemia (Van Bresseem *et al.*, 2001)

Una nuova epidemia con spiaggiamenti di massa (il cui tasso è sovrapponibile all'epidemia del 1990-92) nel Golfo di Valencia nel luglio 2007, propagatasi poi lungo le coste meridionali spagnole del Mediterraneo, delle Isole Baleari, della Catalogna e del Mar Ligure (Raga *et al.*, 2008) venne messa in correlazione con la precedente in quanto si delineò una differenza nella taglia degli animali spiaggiati e si contarono un maggior numero di giovani spiaggiati rispetto agli adulti. Questo portò Raga *et al* (2008) a sostenere che, dopo l'epidemia del 1990-92, i soggetti adulti sopravvissuti mantennero un certo tipo di immunità contro il virus.

Da sottolineare inoltre che entrambe le epidemie che coinvolsero la popolazione delle stenelle del Mediterraneo (nel 1990-92 e 2007) cominciarono da un'area adiacente allo stretto di Gibilterra. Ciò suggerisce che la trasmissione possa essere avvenuta per contatto con cetacei dell'Atlantico (Raga *et al.*, 2008)

Il reservoir del CMV è rappresentato dai globicefali (*Globicephala melas*); sono animali gregari migratori e che sono sufficientemente numerosi per garantire il sostentamento del MV all'interno della loro popolazione (Kennedy *et Stoskopf*, 2001).

Duignan *et al.* (1995) individuarono anticorpi per il morbillivirus nell'86% dei soggetti di due specie di globicefali (*Globicephala melas*) nell'Atlantico occidentale. Si ipotizzò che i globicefali avessero il ruolo di vettori del DMV trasportando il virus dal Nord America al Mar Mediterraneo (Barrett *et al.*, 1995; Van Bresseem *et al.*, 2001; Kennedy, 1998).

Barret *et al.*, (1995) trovarono che il 93% dei soggetti di questa specie, durante lo spiaggiamento di massa che avvenne tra il 1992-93, presentavano sieropositività per il morbilli virus; data l'alta percentuale dei soggetti sieropositivi si ipotizzò che l'infezione nella popolazione fosse enzootica.

La diffusione tra un bacino ed un altro sembra dovuta ad alterazioni nei comportamenti migratori degli animali infetti che può aver reso possibile il contatto con popolazioni indenni da morbillivirus, introducendo il virus il popolazioni immunologicamente non competenti.

Le recenti scoperte molecolari di Taubenberger, (2000) suggeriscono che *G. melas* sia ospite di un differente e nuovo tipo di morbillivirus dei cetacei, filogeneticamente correlato, ma distinto, dai PMV e DMV, chiamato successivamente PWMV (*pilot whale morbillivirus*).

Sia l'origine, sia il meccanismo di diffusione di questi morbillivirus restano una questione aperta. Esistono recenti evidenze epidemiologiche che dimostrano la positività di 11 su 15 specie di odontoceti dell'Atlantico dell'ovest, segno di una diffusa esposizione al virus.

Il morbillivirus può infettare numerose specie senza causare necessariamente malattia clinica (Kennedy *et Stoskopf*, 2001).

I fattori predisponenti la trasmissione di questo virus sono:

- Alta densità di popolazione: ad esempio la densità di stenelle stimata nel Golfo di Valencia nel (0.49 soggetti/km²) è la massima rilevata per questa specie nel Mediterraneo dell'ovest. L'alta densità, verosimilmente, favorisce la diffusione del Morbillivirus (Raga *et al.*, 2008)

- Temperatura: la temperatura delle acque era superiore alla media durante l'inverno precedente all'epidemia del 1990 (Raga *et al.*, 2008).

- Sinergia con inquinanti ambientali.

Sembra sempre più probabile che ci siano effetti sinergici tra il MV ed un'esposizione cronica ad un certo numero di inquinanti ambientali come gli organo clorati, tra cui i PCB e i 4-DDDE, ed alcuni metalli pesanti (Hg, Pb, Cd, etc.) nella modulazione dell'attività patogenetica di MV nei mammiferi marini (Di Guardo *et al.*, 2005; Beineke *et al.*, 2009)

Da un punto di vista patologico macroscopico, negli animali morti durante le epidemie sopra citate si rinvenivano un quadro di polmonite bilaterale grave con consolidamento, congestione ed edema di entrambi i polmoni (quindi non collabibili all'apertura del torace); atelettasia, enfisema interlobulare, subpleurico e mediastinico; si riscontravano frequentemente ascessi polmonari, spesso associati a granulomi parassitari; infine, si osservavano linfonodi polmonari edematosi e aumentati di volume, idrotorace e idropericardio. All'esame microscopico i più comuni quadri patologici erano compatibili con polmonite bronco-interstiziale (Jepson *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2006; Di Guardo *et al.*, 2005; Domingo *et al.*, 1992; Duignan *et al.*, 1992) da multifocale a diffusa, da sub-acuta a cronica, spesso caratterizzata da un'iperplasia più o meno marcata dei pneumociti di tipo II. Si rilevava, inoltre, una necrosi dell'epitelio bronchiale e bronchiolare, la presenza di essudato siero fibrinoso, leucociti, macrofagi e altre cellule mononucleate all'interno del lume bronchiale, bronchiolare e alveolare. Le pareti alveolari mostravano un'iperemia più o meno grave, edema ed epitelializzazione, con emorragie e membrane ialine spesso osservabili all'interno del lume alveolare. Inoltre i setti intra-alveolari presentavano frequentemente edema, fibroplasia prominente e infiltrato infiammatorio formato da macrofagi/istociti, leucociti e linfociti.

L'alterazione sicuramente più suggestiva era rappresentata dalla formazione di larghi, multinucleati sincizi di tipo "Warthin-Finkeldey" endobronchiali, endobronchiolari e endoalveolari e, meno frequentemente, nei setti interalveolari (Di Guardo *et al.*, 2005; Domingo *et al.*, 1992; Duignan *et al.*, 1992).

I sincizi spesso contenevano corpi inclusi eosinofili intracitoplasmatici e/o intranucleari, simili a quelli che si osservano all'interno delle cellule epiteliali bronchiali, bronchiolari

e alveolari. La formazione di questi sincizi nel polmone e nel cervello potrebbero essere considerati utili indicatori dell'infezione da MV (Duignan *et al.*, 1992).

I corpi inclusi possono presentarsi come singoli o multipli, approssimativamente di 10-20 um di diametro, di forma da ovale a rotondeggiante, con margini distinti. Queste inclusioni, assieme a tipi cellulari linfoidi e di altro tipo, vengono spesso trovati positivi immunostochimicamente all'antigene del morbillovirus.

L'infezione virale è spesso accompagnata da infezioni batteriche o parassitarie secondarie, dovute all'azione immuno-soppressiva propria del virus (Di Guardo *et al.*, 2005; Beineke *et al.*, 2009). I linfonodi sono un bersaglio primario di agenti infettivi e delle malattie infiammatorie. Epidemie e casi sporadici di CMV (PMV e DMV), riportati in diverse specie di cetacei tra cui tursiopi e stenelle (Di Guardo *et al.*, 2005, Miller *et al.*, 2002; Kennedy, 1998), provocando leucopenia e immunosoppressione, predispongono a infezioni opportunistiche (batteriche, parassitarie, micotiche).

Come accade nel cimurro canino, il CMV induce estensiva linfocitosi e corpi inclusi eosinofili citoplasmatici e nucleari nelle cellule linfoidi e generalizzata deplezione degli organi linfoidi; PMV e DMV sono caratterizzati dalla presenza di cellule giganti multinucleate e sincizi all'interno delle cellule linfoidi (Di Guardo *et al.*, 2005, Kennedy, 1998).

All'esame immunostochimico si sono potuti identificare una grande quantità di antigeni virali grazie all'utilizzo di anticorpi specifico monoclonale in grado di riconoscere e discriminare differenti epitopi del morbillovirus (Domingo *et al.*, 1992; Kennedy, 1998).

La diagnosi, quindi, si basa sulla presenza di lesioni istopatologiche caratteristiche e supportate dall'immunostochimica e dalla microscopia elettronica. L'RNA virale si individua in tessuti freschi o fissati usando la tecnica PCR (polymerase chain reaction).

Ad oggi è disponibile la tecnica ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) che permette di isolare l'antigene direttamente da tessuti omogenati. L'isolamento virale in cellule di rene è difficoltoso a meno che la carcassa non sia fresca (Smith *et al.*, 2008).

Per confermare un'infezione da morbillo virus possono essere utilizzati sia doppi campioni sierici che mostrano un aumento del titolo anticorpale, sia un singolo campione sierico con alto titolo di IgM.

Si suppone che *cetacean morbillivirus* possa avere effetti a lungo termine sulle dinamiche di popolazione dei cetacei sia come infezione enzootica, sia come ricorrente epizozia; quest'ultima può avere un grande impatto negativo dal momento che colpisce gli individui sessualmente maturi (Van Bresse *et al.*, 1999).

Influenza Virus: nei cetacei sono stati isolati due sottotipi di influenza virus da un globicefalo spiaggiato lungo le coste del Maine nel 1984 (Hinshaw *et al.*, 1986). In questo caso, il polmone si presentava emorragico e i linfonodi ilari fortemente aumentati di volume. Sono stati considerati come fattori predisponenti sia l'alta densità di popolazione sia l'inconsueta, alta temperatura delle acque (Kennedy *et Stoskopf*, 2001).

Herpes virus: non si hanno molte informazioni riguardo alle infezioni sostenute da questo patogeno nei cetacei. Nei pinnipedi si riporta il caso di una giovane foca vitulina con sintomi sistemici e respiratori, giunta a morte in 1-6 giorni. Nelle foche si sottolinea l'importanza della differenziazione tra la polmonite interstiziale da herpesvirus e la broncopolmonite da influenzavirus. Caratteristica la presenza di corpi inclusi intranucleari.

Nei polmoni di due tursiopi sono stati isolati due nuovi alfa-herpesvirus che hanno determinato, sia macroscopicamente che istologicamente, lesioni necrotizzanti (Blanchard *et al.*, 2001). Nello stesso anno Esperon *et al.* (2008) riportavano lo spiaggiamento di un tursiopo sulle coste delle Isole Canarie dal cui polmone, tramite indagini molecolari, veniva isolato un herpesvirus. Questo rappresenta la prima segnalazione di infezione da herpes simplex-like in un delfino spiaggiato. Stress e immunosoppressione sono associati alla recrudescenza delle infezioni latenti e quindi favorevoli all'insorgenza di infezioni secondarie. Non esistono dati che supportino l'ipotesi che l'herpesvirus sia un agente zoonotico all'interno delle popolazioni di cetacei e pinnipedi.

Rhabdovirus: Osterhaus *et al.* (1993) hanno isolato un rhabdovirus-like (definito tale in base alla morfologia al microscopio elettronico, ma non riconosciuto dai test antisierici per tre generi di rhabdovirus animali conosciuti) da polmone e rene di un lagenorinco (*Lagenorhynchus albirostris*) spiaggiato di cui non venivano descritte le lesioni. Molti dei

cetacei spiaggiati sulle coste del Nord ovest Europeo e nel Mar Mediterraneo tra il 1988 e il 1992 presentavano anticorpi neutralizzanti contro il virus.

1.6.2 Batteri

Il sistema respiratorio dei cetacei si posiziona ai vertici della lista degli organi colpiti da batteri patogeni. Nei mammiferi marini selvatici e di ambiente controllato, le patologie respiratorie batteriche sono frequentemente una conseguenza di pesanti infestazioni parassitarie.

Howard *et al.* (1983) riportano una polmonite puramente batterica come causa principale di morte in cetacei in acque hawaiane; Kinoshita *et al.* (1994) approfondivano lo studio di multiple morti in tursiopi dovute a polmonite da *Staphylococcus aureus*.

Studi riguardanti patologie di delfini in cattività riferiscono che è comune la morte per polmonite batterica (Medway *et Schryver*, 1973; Sweeney *et Ridgway*, 1975; Buck *et Spotte*, 1986). Una significativa parte dei cetacei con diagnosi di problemi alle vie respiratorie esibiscono ascessi polmonari.

Staphylococcus aureus e *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella sp.*, *Streptococcus sp.*, *Aeromonas sp.*, sono stati i patogeni più isolati; meno frequentemente, ma comunque ordinari, i patogeni isolati sono gram negativi. (Lawrence *et al.*, 2001; Howard *et al.*, 2000). Macroscopicamente i polmoni assumono un aspetto marmorizzato, con aree grigio biancastre, alternate a zone rosso scuro intenso. Sono generalmente iperemici e i vasi superficiali appaiono congesti. La loro consistenza è aumentata e alla superficie di taglio si evidenzia fuoriuscita di essudato purulento da bronchi e bronchioli. In alcuni casi si osservano lesioni ascessuali contenenti materiale purulento biancastro.

Istologicamente nella fase acuta si osserva un tipico quadro di broncopolmonite caratterizzato dalla presenza di neutrofilo e fagociti mononucleati negli spazi respiratori (bronchi e bronchioli). La fase cronica è caratterizzata da un aumento del numero di macrofagi, muco ed aggregati batterici con iperplasia della mucosa (Mazzariol S., 2002)

Actinobacillus sp.: *Actinobacillus delphinicola*, batterio di forma bastoncellare appartenente alla Fam. *Pasteurellaceae*, venne isolato per la prima volta nel 1996 da Foster *et al.*, 1998 dal polmone di cetacei (*Stenella coeruleoalba* e *Phocoena phocoena*) spiaggiati lungo

le coste scozzesi. In questo studio destò particolare interesse l'osservazione che il ceppo genotipico batterico era lo stesso a prescindere dal tipo di ospite infettato.

Nel 1998, Foster *et al.*, identificarono in una focena (*Phocoena phocoena*) un secondo tipo di *Actinobacillus*, filogeneticamente molto simile al precedente, che venne nominato *A. scotiae* e ritenuto il responsabile di setticemia in un animale spiaggiato.

Brucella sp.: la brucellosi era considerata una patologia dei mammiferi terrestri ma oggi possiamo affermare, grazie a numerosi dati, che la patologia colpisce anche i mammiferi dell'ambiente marino: il primo caso è rappresentato da un feto abortito di un *T. truncatus* in cattività in California nel 1994 (Ewalt *et al.*, 1994). Si sono susseguite quindi varie segnalazioni di isolamento di *Brucella sp.*: dal 1996 vennero segnalati casi in varie specie di cetacei, dalla Scozia agli USA (California e stato di Washington), nell'oceano Pacifico meridionale e nel Mar Mediterraneo (Higgins, 2000; Hernandez-Mora *et al.*, 2009 ;Ross *et al.* 1996; Van Bresseem *et al.*, 2001).

Sono stati individuati particolari ceppi di *Brucella* che interessavano rispettivamente pinnipedi (*B. Pinnipedialis*) e cetacei (*B. Ceti*). Quest'ultimo si suddivide a sua volta in due gruppi a seconda che l'ospite preferenziale sia la focena o il delfino. (Dawson *et al.*, 2008) Una femmina adulta di *Pseudalius inflexus*, un nematode isolato dal polmone di un giovane maschio di focena spiaggiato e trovato morto sulle coste del Regno Unito, è risultata infetta da *Brucella sp.*; questo fatto suggerisce che i parassiti si possono considerare potenziali veicoli di infezione batterica e mette in luce il rischio zoonosico per gli esseri umani (Dawson *et al.*, 2008).

Salmonella sp.: la salmonellosi rappresenta un grande problema in quanto pericolosa per la salute pubblica. *Salmonella sp.* è stata isolata da diverse specie di cetacei e il polmone è il tessuto da cui il patogeno viene più spesso isolato (Valderamma Vasquez *et al.*, 2008). Grazie allo studio condotto da Valderamma *et al.* (2008) su reperti patologici delle carcasse di cetacei spiaggiati o catturati dai pescherecci tra il 1990 e il 2002, infette da *Salmonella*, si può affermare che il batterio sia un normale componente della flora commensale del polmone dei cetacei e che, in determinate condizioni, può diventare un patogeno opportunista.

Staphylococcus delphini: nel 1988 un nuovo tipo di staphylococco venne descritto nei

cetacei: lo *Staphylococcus delphini* (Higgins, 2000).

Streptococcus sp.: risale al 1980 una segnalazione di un caso di broncopolmonite con focolai di necrosi a margini netti disseminati nel polmone da *Streptococcus equi* in un globicefalo del Nord Atlantico (Higgins, 2000).

In uno studio sulle lesioni polmonari delle focene é stata riscontrata un caso di polmonite purulenta o necropurulenta associata ad infezione batterica secondaria o a setticemia in casi di *Streptococcus canis*, *Salmonella species*, *Escherichia coli* e *Streptococcus lactis* (Jepson *et al.*, 2000).

Vibrio sp.: *Vibrio alginolyticus* e *Vibrio damsela* sono i più comuni patogeni isolati da espettorato dallo sfiatatoio e da campioni fecali di cetacei (Buck *et al.*, 2006).

Pasteurella sp.: la pasterellosi in genere si manifesta come setticemia acuta o iperacuta. A livello polmonare il batterio provoca una broncopolmonite che, macroscopicamente, conferisce un aspetto umido al polmone. Alla necropsopia si osservano lesioni associabili a batteriemia/setticemia e si osservano polmoni edematosi e linfadenite acuta diffusa. In letteratura è riportato un caso di decesso in seguito a tracheite emorragica in una popolazione di delfini colpiti da *P. hemolytica* (Lawrence *et al.*, 2001; Medway *et Schryver* (1973) raccolgono *Pasteurella sp* dai polmoni di un tursiope con broncopolmonite emorragica. Nella maggior parte dei casi *P. multocida* è stata isolata come reperto accidentale non associato a malattia (cetacei mantenuti in cattività e in uno con decesso iperacuto).

Nocardia sp.: è un organismo ubiquitario che si trova nel suolo, nei vegetali e nelle acque. La nocardiosi si può presentare in diverse forme cliniche in relazione all'organo colpito. Essendo i cetacei molto suscettibili alle infezioni delle vie aeree, l'apparato respiratorio spesso rappresenta un facile bersaglio dell'infezione (Lawrence *et al.*, 2001).

A livello polmonare si rileva un quadro compatibile con polmonite pio-granulomatosa, da multifocale a diffusa, che talvolta può essere associata a pleurite, tracheite e bronchite fibrino-emorragica, con formazione di ascessi polmonari (Degollada *et al.*, 1996; St. Leger *et al.*, 2009).

L'infezione, in genere, provoca una risposta suppurativa che può esitare in formazione di granulomi. L'infezione da polmonare, attraverso l'erosione della parete dei vasi, può

estendersi al circolo e diventare disseminata. (Lawrence *et al.*, 2001).

St. Leger *et al.* (2009) esaminarono un totale di 10 cetacei, 8 su 10 presentavano interessamento polmonare e dei linfonodi toracici; in seguito a identificazioni molecolari e isolamento batterico, si dimostrò la presenza di *N. asteroides*, *N. farcinica*, *N. brasiliensis*, *N. cyriacigeorgica*, e *N. levis*. I batteri vennero evidenziati attraverso colorazione Grocott's methenamine silver; gli autori constatarono, inoltre, che gli individui giovani risultavano infetti più spesso degli adulti.

Bartonella sp.: è un piccolo bacillo intracellulare gram-negativo, ubiquitario, responsabile nell'ospite immunocompetente e immunocompromesso di un ampio spettro di condizioni cliniche; in sede polmonare si possono osservare quadri di polmonite, pleurite o infiltrati polmonari asintomatici (in letteratura non sono riportati dati riguardanti lesioni nei cetacei, pertanto occorre far riferimento ai soli studi effettuati sull'uomo).

Bartonella henselae ed una specie non identificata di *Bartonella sp.*, sono state individuate attraverso il sequenziamento in diversi gruppi di cetacei a vita libera (tursiopi) e in cattività. Il batterio è stato individuato più frequentemente in soggetti evidentemente debilitati, come quelli spiaggiati e in soggetti costretti a convivere in cattività con animali malati. Le cause che provocano la malattia non sono state stabilite (Harms *et al.*, 2008)

1.6.3 Agenti fungini

Le lesioni fungine primarie al polmone sono dovute principalmente ad inalazione diretta di spore fungine e con successiva diffusione miliare agli organi addominali (Sweeney *et al.*, 1976). Le lesioni micotiche sono associate a polmonite necropurulenta cronica (Jepson *et al.*, 2000). Le infezioni micotiche, di norma, si possono considerare secondarie a fattori predisponenti come immunosoppressione, stress da cattività o malnutrizione.

L'infezione micotica più comune tra i mammiferi marini è l'aspergillosi polmonare che è stata riscontrata in *T. truncatus* affetto da DMV. Altri opportunisti sono: *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, gli zigomiceti sistemici.

All'interno del tratto respiratorio dei cetacei sani si può osservare spesso *Candida* senza che la sua presenza rappresenti un problema per l'ospite; questo è vero fino a quando non invade i tessuti sani e il sistema immunitario dell'animale non risulta compromesso

(Sweeney *et Reddy*, 2001). Quando diventa invasiva *Candida* tende a formare pseudoife. *Aspergillus sp.*: si ritiene sia la principale causa di micosi polmonare nei mammiferi marini (Higgins, 2000). Reidarson *et al.* (1998a) riportano il caso di *T. truncatus*, un maschio di 4 anni, affetto da polmonite da *A. fumigatus*; all'esame citologico e microbiologico del liquido di lavaggio broncoalveolare e del un raschiato di lesioni prominenti giallastre endobronchiali si potevano identificare elementi fungini. Le lesioni pio-granulomatose e necrotizzanti con distribuzione focale (polmonite granulomatosa grave o polmonite necrotico emorragica in 3 stenelle (Domingo *et al.*, 1992), spesso associate e linfadenite necro-purulenta e, a livello di trachea, grandi noduli che protrudono sulla superficie della mucosa. Microscopicamente *Aspergillus sp.* si distingue per le ife settate che infiltrano la mucosa, il parenchima polmonare e i linfonodi e per la presenza di cellule giganti multinucleate (Jepson *et al.*, 1999). Le spore proliferano molto velocemente ed invadono il tessuto bronchiale provocando infarti (Reidarson *et al.*, 2001).

Blastomyces sp.: gli animali che si infettano attraverso l'inalazione del patogeno sviluppano le prime lesioni a livello polmonare. In letteratura l'infezione e' stata segnalata solo in un caso di tursiope subadulto mantenuto in cattività per sei mesi nelle Hawaii (Cates *et al.*, 1986). Tale articolo però non riporta informazioni approfondite riguardanti le lesioni associate.

Coccidioides sp.: la descrizione del primo caso di coccidiomicosi in un cetaceo risale al 1998. L'infezione polmonare da *Coccidioides neoformans* e' stata rilevata all'esame necroscopico di in un tursiope di sette anni spiaggiato in California, in cui è stato rilevato un nodulo compatto subpleurico nel polmone sinistro (Reidarson *et al.*, 1998).

Criptococcus neoformans: è un microrganismo saprofita che ha come sito di infezione preferenziale il polmone. Un maschio di tursiope colpito da criptococcosi presentava broncopolmonite associata a pleurite (noduli multipli con consistenza viscosa, consolidamento del parenchima e ispessimento pleurico) (Miller *et al.*, 2002). Istologicamente si sviluppa una risposta istiocitaria da lieve a moderata.

Histoplasma sp.: l'istoplasmosi è causata da *H. capsulatum*; la via di entrata del patogeno è il tratto respiratorio, in cui sono localizzate le lesioni primarie, da cui può disseminarsi e raggiungere le altre parti dell'organismo (Higgins; 2000).

Zigomicosi: termine che indica un insieme di micosi sostenute da una varietà di funghi tra cui *Absidia*, *Rhizopus*, *Mucor*, e *Mortierella sp.* Sono organismi ubiquitari e opportunisti; l'infezione avviene in caso di fattori predisponenti come danni tissutali da trauma o soppressione del sistema immunitario. Le lesioni tipiche sono formazioni granulomatose che contengono le ife non settate dell'organismo patogeno che possono diffondersi anche al polmone provocando trombosi, embolismi e infarto (Higgins, 2000).

1.6.4 Parassiti

“I piani di salvaguardia e conservazione della popolazione dei mammiferi marini sono un problema di interesse pubblico; nonostante questo, si conosce ben poco riguardo al ruolo dei parassiti nelle dinamiche di popolazione di questi soggetti. Questo probabilmente è dovuto alla difficoltà nella raccolta dei campioni, alla scarsa conoscenza della biologia di ospiti e parassiti e agli elevati costi e ostacoli nell'esecuzione di studi sperimentali” (Raga *et al.*, 1997).

I parassiti sono i patogeni che più frequentemente si incontrano ma, nonostante il danno tissutale, da soli non costituiscono una minaccia per l'animale. Molte patologie possono causare debilitazione, peggioramento dello stato di condizione corporea, immunodepressione (es. toxoplasmosi, morbillivirus, tossici ambientali). Allo stesso tempo, condizioni ambientali avverse, nutrizione insufficiente o non idonea, stress cronici da disturbo o competizione possono causare stati di immunodepressione (Beineke *et al.*, 2009) tali da favorire l'insorgenza di patologie sostenute da organismi opportunisti.

I parassiti possono giocare un ruolo non solo a livello di scala ecologica, ma anche a livello di scala evoluzionistica (Mazzariol *et al.*, 2007).

I parassiti si dividono in due grandi categorie: i protozoi e gli eumetazoi (endoparassiti e ectoparassiti).

I Protozoi appartengono al regno dei protisti e sono organismi eucarioti unicellulari (Urquhart *et al.*, 1998). Contengono uno o più nuclei visibili al microscopio ottico e sono provvisti di membrana nucleare. Sono dotati di movimento per mezzo di organuli specifici in almeno una fase della loro vita (Pampiglione *et Canestri Trotti*, 1990).

I protozoi che si riscontrano nell'apparato respiratorio degli odontoceti sono:

Kyaroikeus cetarius (Subphylum: *Ciliophora*; Genere: *Planilamina*): è un parassita individuato per la prima volta nello sfiatatoio di un *T. truncatus*; si suppone che questo protozoo ciliato sia un agente opportunistico ed è, probabilmente, l'unico endoparassita facoltativo dei mammiferi marini (Geraci *et* Aubin, 1987). Si localizza comunemente a livello di sfiatatoio, polmoni, linfonodi e cute degli animali a vita libera (Woodard *et al.*, 1969; Sweeney *et* Reddy, 2001)

Non è ancora stato stabilito il suo ruolo patogenetico a livello polmonare (Dailey, 2001).

Toxoplasma gondii (Phylum: *Apicomplexa*; Genere: *Toxoplasma*) ha come ospiti *T. truncatus* e *S. coeruleoalba* e risulta presente almeno in tre specie nel Mar Mediterraneo (Cabezón *et al.*, 2004).

La trasmissione dell'infezione in ambiente terrestre può avvenire per 3 vie:

- ingestione di oocisti sporulate con acqua o cibo contaminato;
- ingestione di cisti tissutali;
- infezione congenita.

Si ipotizza che la principale forma di contagio per i mammiferi marini sia rappresentata dalla presenza di oocisti contenute nelle feci dei felini domestici che vengono liberate, tramite le acque di scolo, nell'ecosistema marino (Conrad *et al.*, 2005; Mikaelian *et al.*, 2000; Dubey *et al.*, 2009). È stata riscontrata anche la trasmissione congenita per via transplacentare in un *Grampus griseus* (Resendes *et al.*, 2002), il cui feto presentava di necrosi coagulativa in vari organi tra i quali il polmone. (Resendes *et al.*, 2002).

Le oocisti sono molto resistenti all'ambiente e possono sporulare e rimanere vitali in ambiente marino per diversi mesi (Lindsay *et al.*, 2003). Le lesioni polmonari comprendono: polmonite interstiziale diffusa (Resendes *et al.*, 2002), rinvenimento di tachizoiti, forme poco resistenti all'ambiente esterno, nel parenchima polmonare (Bowater *et al.*, 2003; Beneike *et al.*, 2009); a livello di linfonodi polmonari si osserva linfadenite necrotizzante da moderata a grave (Domingo *et al.*, 1992). In generale nei delfini l'infezione da *Toxoplasma*, diffusa a livello mondiale, è stata riscontrata in animali giovani, spesso in associazione ad infezioni da morbillivirus o in soggetti immunodepressi (Domingo *et al.*, 1992; Dubey *et*

al., 2008;).

- *Holotrica sp.* (Subphylum: *Ciliophora*; Genere: *Holotrica sp.*): provoca polmonite di tipo suppurativo che colpisce soprattutto gli alveoli; è associata ad aree emorragiche e presenza di protozoi nel parenchima polmonare. All'interno di laringe, trachea e bronchi si possono osservare grandi quantità di essudato solidificato. Non bisogna dimenticare che, comunque, evidenti infestazioni da parte di questi ciliati sono da considerarsi un reperto comune nei cetacei (Sweeney *et Reddy*, 2001).
- *Kinetoplastidi* (Phylum: *Kinetoplastida*): sono protozoi flagellati, alcuni a vita libera, a cui appartengono numerose forme commensali e parassite. Sono stati isolati dalla campionatura di muco dallo sfintere di un tursiopo in cattività (Dailey, 2001).

Il sottoregno degli eumetazoi comprende organismi eucarioti, con differenziazione cellulare, eterotrofi e mobili almeno durante uno stadio della loro vita. Da questo si staccano il phylum dei *Platelminti* che comprende due classi: i trematodi e i cestodi. La classe dei *Trematoda* si divide in due sottoclassi principali, Monogenea, parassiti a ciclo diretto, e Digenea, parassiti a ciclo indiretto, che risiedono in uno o più ospiti intermedi (Urquhart *et al.*, 1998).

Nasitrema sp. è uno dei trematodi digenei più comuni che parassita cavità nasali, seni cranici e l'interno dell'apparato uditivo di molti odontoceti (Morimitsu *et al.*, 1987). Nelle sacche nasali esemplari del genere *Nasitrema sp.* sono associati alla presenza di essudato mucoso bruno-rossastro, mentre microscopicamente si rilevano reazioni infiammatorie leucocitarie multifocali. Infestazione da *Nasitrema sp.* è spesso associata a pesanti parassitosi da parte di *K. Cetarius* (Sniezek *et al.*, 1995) Numerosi spiaggiamenti sono stati messi in correlazione con la migrazione di questo parassita all'interno del cervello.

Parassiti appartenenti alla classe dei cestodi non sembrano interessare l'apparato respiratorio.

La classe *Nematoda* (Phylum: *Nemathelminthes*) è costituita da organismi vermiformi a simmetria bilaterale. I nematodi sono chiamati anche vermi cilindrici perché presentano un corpo cilindrico a sezione trasversale circolare; il ciclo vitale è sia diretto che indiretto. Le lesioni da nematodi hanno prevalentemente localizzazione alveolare e comprendono la polmonite interstiziale multifocale subacuta o cronica di tipo granulomatoso, associata

a ispessimento interstiziale in seguito alla formazione di infiltrato linfoplasmacellulare di entità variabile e di fibrosi interstiziale moderatamente estesa. Si evidenziano inoltre, multifocalmente, in posizione intralveolare, cellule multinucleate; infine si osservano focolai di atelettasia o enfisema e microgranulomi parassitari con centro necrotico e calcificato (Jepson *et al.*, 2000), associate a un quadro infiammatorio cronico da moderato a grave. Tali reperti sono stati spesso descritti in assenza di parassita.

I nematodi che parassitano l'apparato respiratorio dei cetacei appartengono a due famiglie: *Pseudaliidae* e *Crassicaudidae* (Dailey, 2001). Gli effetti patogeni degli pseudalidi dipendono dalla loro localizzazione (bronchi, bronchioli, alveoli), dalla quantità, dalla specie, dallo stadio (larve o adulti) e da fattori che dipendono dall'ospite come: specie, età, stato immunitario e presenza di altri agenti infettivi.

La presenza di pseudalidi nell'organismo dei cetacei aumenta con l'età del soggetto, il che suggerisce una trasmissione orizzontale attraverso la catena alimentare (Clausen *et Andersen*, 1988; Faulkner *et al.*, 1997). Quanto detto vale per tutti gli pseudalidi ad eccezione di *Halocercus sp.*, trovato prevalentemente in focene e delfini giovani, il che suggerisce l'ipotesi di una trasmissione transplacentare o transmammaria. (Caldwell *et Caldwell*, 1968; Measures, 2001)

Gli pseudalidi sono strongili broncopolmonari che si localizzano nei seni craniali e che possono provocare ispessimento della mucosa o raramente sinusite purulenta. (Measures, 2001). *Pseudalius inflexus*, *Torinurus convolutus*, *Stenurus ovatus*, *Skrjabinalius sp.*, a causa della loro presenza fisica, possono provocare la quasi totale ostruzione dei bronchi e dei bronchioli. Le lesioni associate sono: broncopolmonite suppurativa, polmonite interstiziale cronica, bronchiti da acute a croniche, endobronchiti, peribronchiti, bronchioliti più o meno gravi a seconda del numero di elminti presenti; aree focali di atelettasia, ipertrofia, iperplasia dell'epitelio mucosale e ipertrofia della muscolatura liscia peribronchiale. Vengono occasionalmente riportate erosioni dell'epitelio bronchiale (Cornaglia, *et al*, 2000) (Manfredi *et al* 2005).

In associazione a infezione da pseudalidi si possono sviluppare infezioni batteriche o virali secondarie che possono esitare nella formazione di ascessi o setticemia.

Stenurus ovatus parassita lo sfiatatoio, i bronchi e i bronchioli di *T. truncatus* e *S. coeruleoalba* (Delyamure, 1955; Manfredi *et al.*, 2005; Kuwamura *et al.*, 2007), ha un ciclo biologico indiretto. Microscopicamente si osserva un quadro variabile dalla bronchiolite muco purulenta con iperplasia e metaplasia squamosa dell'epitelio bronchiale e bronchiolare, all'iperplasia delle ghiandole mucose, fibrosi interstiziale da moderata a grave ed infiammazione granulomatosa, soprattutto attorno al sito d'attacco dei parassiti (noduli multipli di consistenza dura, con un diametro di 1-3 mm, distribuiti in tutto il polmone). Vengono descritti, inoltre, edema, enfisema, atelettasia focale ed ipertrofia della muscolatura peribronchiolare. Si osservano anche segni di congestione polmonare ed essudato sieroso nel lume della trachea e dei bronchi. I linfonodi polmonari e bronchiali possono presentarsi aumentati di volume.

Skryabinalius sp. i cui ospiti sono *T. truncatus*, *S. coeruleoalba*, *D. delphis* (Delyamure, 1955; Troncone *et al.*, 1994; Manfredi *et al.*, 2005), ha un ciclo biologico indiretto e si localizza principalmente nell'apparato respiratorio. La porzione cefalica del corpo è spesso attorcigliata su se stessa ed infissa nel parenchima polmonare (immersa in materiale mucopurulento circondato da una capsula fibrosa che può calcificare), mentre il resto del corpo è libero nel lume bronchiale e bronchiolare (Raga *et al.*, 1987; Macchioni et Barducci, 1989; Canestri Trotti *et al.*, 1990; Troncone *et al.*, 1994; Manfredi *et al.*, 2005). Può raggiungere una lunghezza di 8 cm. L'azione patogena consiste in ostruzione di bronchi o bronchioli.

Pseudalius inflexus è il più grande nematode polmonare, si rinviene generalmente nell'albero bronchiale e occasionalmente nei vasi polmonari (forme larvali) (Jepson, 2000). L'infestazione avviene entro i primi dodici mesi di vita dell'animale che da qui rimane infetto. In associazione ai siti di inserzione di *P. inflexus* (aderiscono alla parete bronchiale con l'estremità anteriore immersa in materiale mucopurulento circondato da una capsula fibrosa che può calcificare), nei piccoli bronchi e bronchioli, si notano microfocolai di necrosi della mucosa associata a calcificazioni.

Torinurus convolutus: ha una localizzazione prevalentemente bronchiale, sembra probabile un'infezione per via verticale (Jepson, 2000).

Halocercus sp. parassita *T. truncatus*, *S. coeruleoalba*, *D. delphis* e si localizza preferenzialmente nei piccoli bronchi e bronchioli (Baylis *et* Daubney, 1925; Delyamure, 1955; Frati *et al.*, 1996; Fognani, 2005). La sua presenza sembra essere correlata negativamente con lo stato di nutrizione. Le due specie più comuni nelle acque del Mediterraneo sono *H. tauricus* e *H. invaginatus*, la prima sembra determinare una maggiore risposta immunitaria nell'ospite (reazione di incapsulamento del parassita). L'infezione attiva da parte del parassita è associata alla presenza di forme larvali nei campioni di espettorato (Sweeney *et* Reddy, 2001). Un maggior numero di *Halocercus sp.* sono stati rinvenuti nei soggetti giovani, il che suggerisce la possibilità di trasmissione verticale (Murray Dallay *et al.*, 1991; Conlogue *et al.*, 1985; Measures, 2001).

Le specie del genere *Halocercus*, a causa delle spine cuticolari, causa una fase iniziale acuta che interessa l'epitelio bronchiale e bronchiolare, che porta alla desquamazione ed alla formazione di infiltrato formato da granulociti neutrofilici.

Le lesioni che si associano alle infestazioni da *Halocercus* sono: bronchiti mucopurulente, peribronchiti, polmoniti, edema alveolare e interstiziale, aree focali di enfisema e atelettasia, ipertrofia degli sfinteri muscolari dei bronchioli terminali. I parassiti sono osservabili all'interno del parenchima polmonare e sono considerati particolarmente istolesivi. Viene occasionalmente riportata l'erosione dell'epitelio bronchiolare e alveolare. La flogosi che si riscontra a livello alveolare sarebbe da collegare alla migrazione larvale (Howard *et al.*, 1983). L'infezione acuta è associata a emorragie intralveolari, mentre quella cronica a piccoli noduli biancastri subpleurici (reazione granulomatosa a cui può seguire calcificazione).

Parassitosi da *Halocercus invaginatus*, *Pseudalius inflexus*, *Torinurus convolutus* sono state riscontrate in focene catturate con il by-catch nelle acque norvegesi e islandesi (Lehnert *et al.*, 2005); in focene catturate con by-catch o spiaggiate nelle acque tedesche del Mar Baltico e del Mare del Nord e, ancora, delle acque norvegesi, oltre ai precedenti tre parassiti è stato individuato anche *Stenurus minor*. Entrambe le parassitosi erano associate a polmonite causata principalmente da infezioni batteriche secondarie (*Streptococcus beta haemolyticus*) (Siebert *et al.*, 2001).

1.6.5 Varie

Polmonite e broncopolmonite sono frequentemente osservati in molti mammiferi marini associati a una varietà di agenti infettanti e esposizione a tossici ma sono anche occasionalmente osservati in assenza di ovvi patogeni (Howard *et al*, 1983).

I mammiferi marini si posizionano ai vertici della catena alimentare e in quanto tali sono esposti a un'enorme quantità di sostanze tossiche lipofile che pregiudicano il loro stato di salute (70-71) predisponendoli a parassitosi e infezioni batteriche. Allo stesso tempo si deve considerare la quantità di adattamenti morfologici e funzionali (adattamenti fisiologici e biochimici all'immersione a grandi profondità, grande sistema di immagazzinamento attraverso sangue e lipidi e grandi variazioni stagionali nella quantità e mobilizzazione del grasso di riserva) che possono influenzare suscettibilità e resistenza alle sostanze tossiche (sostanze lipofile).

L'effetto negativo degli xenobiotici sul sistema immunitario dei mammiferi marini, pur essendo tutt'ora in discussione, trova conferme in eventi come: l'aumentata incidenza di neoplasie nei beluga (*Delphinapterus leucas*) dell'estuario di St. Lawrence potenzialmente attribuiti a effetti cancerogeni o alla ridotta risposta immunitaria antitumorale dovuta a benzoapireni e PCB (policlorbifenili) l'individuazione di alti livelli di accumulo di xenobiotici nelle stenelle morte durante l'epidemia di morbillivirus nel Mar Mediterraneo nel 1990-91, il che permise di fare speculazioni sull'implicazione del fattore inquinamento ambientale nell'eziologia della malattia. Il polmone risulta essere l'organo target per sostanze tossiche come brevetossine (inalazione) che può provocare grave congestione, edema e emorragie a nasofaringe e polmone (rinite catarrale) e PCB (policlorbifenili) che accumulandosi nel polmone possono provocare danno cellulare; si è osservato inoltre che possono esacerbare patologie associate a morbillivirus (O'Hara *et O'Shea*, 2001).

1.7 Mineralizzazioni, particolato esogeno e endogeno a livello polmonare

La letteratura sugli odontoceti non ci fornisce dati riguardo le mineralizzazioni polmonari; in veterinaria esistono due forme di calcificazioni (deposizione di sali di calcio sottoforma di fosfati o carbonati): distrofiche e metastatiche.

Le prime, tipiche dell'età avanzata, si manifestano anche in assenza di squilibri del metabolismo del calcio e spesso sono associate, microscopicamente, ad aree di necrosi (granulomi contenenti parassiti morti).

La calcificazione metastatica è conseguente ad uno stato di ipercalcemia secondaria a: insufficienza renale, ipervitaminosi D, iperparatiroidismo (Blois *et al.*, 2009), neoplasie osse primarie o metastatiche, dietetiche (bassa assunzione di calcio e alta di fosforo) (Estepa *et al.*, 2006; Ronald *et al.*, 2007) ed infine sindrome uremica (Block *et* Hulbert-Shearon, 1998).

La tonaca media dei vasi, la lamina propria della mucosa delle vie respiratorie (Gilka *et* Sudgen, 1984) e i setti alveolari, risultano le strutture polmonari primariamente colpite dalle mineralizzazioni metastatiche.

All'apertura del torace i polmoni non collassano e alla palpazione ha un aspetto finemente granulare. Microscopicamente le lesioni variano da calcificazione della membrana basale alveolare a ossificazioni polmonari eterotopiche. A meno che non siano inserite in un quadro come la sindrome uremica o l'iperparatiroidismo, di per sé le calcificazioni non hanno un grande significato clinico.

Le polveri di carbone sono ubiquitarie nell'ambiente, ci si aspetterebbe d'altra parte che l'aria delle aree marine sia meno interessata dalla presenza di particolato; invece l'antracosi è stata osservata nei polmoni e nei linfonodi ilari di *Tursiops truncatus* e *Globicephala macrorhynchus* spiaggiati in Florida (Rawson *et al.*, 1995).

Una volta raggiunti gli alveoli, il particolato viene fagocitato dai macrofagi e trasportato attraverso i vasi linfatici ai linfonodi tracheobronchiali regionali ed essendo inerte, permane a livello tissutale per tutta la vita dell'animale. Microscopicamente il carbonio ha l'aspetto di un particolato finemente granulare e può essere extra o intramacrofagico (Kawashima *et al.*, 2004). I setti alveolari e le aree peribronchiali

o peribronchiolari sono le sedi in cui più comunemente si osservano foci di antracosi (Lopez, 2007).

Nei macrofagi interstiziali di diverse specie di odontoceti sono stati osservati pigmenti verde-giallastri possibilmente riferibili a accumuli di lipofuscina, ceroidi o entrambi. La lipofuscina, composta di residui dell'ossidazione di lipidi e proteine, si accumula nelle cellule in fase postmitotica o in quelle caratterizzate da una divisione lenta (Lopez, 2007). I ceroidi invece vengono associati a stati patologici come malnutrizione, deficienza di vitamina E ed a differenza della lipofuscina sembrano avere effetti nocivi sulle cellule. Microscopicamente la lipofuscina ed i ceroidi presentano le stesse caratteristiche istologiche e istochimiche; risultano infatti positive a colorazioni quali Sudan black, oil-red.O, PAS e Ziehl Neelsen.

Emosiderina intracellulare è stata regolarmente osservata in prossimità dei vasi sanguigni nelle aree di infiammazione cronica (Simpson *et* Gardner, 1972).

1.8 Neoplasie

Il riconoscimento di formazioni neoplastiche è nettamente aumentato negli ultimi vent'anni grazie al maggior numero di esemplari di mammiferi marini sottoposti a esame patologico. Per quanto concerne i cetacei ci sono numerose le descrizioni di neoplasie riguardanti beluga (*Delphinapterus leucas*) dell'estuario di St. Lawrence (Gulland *et al.*, 2001).

La diversa incidenza neoplastica tra le specie è dovuta soprattutto alla diversa interazione con l'uomo ma, anche, alle differenti eziologie (fisiche, chimiche, agenti infettivi); gli effetti di questi carcinogeni sono modulati a loro volta da fattori genetici, età, ormoni. L'eziologia della maggior parte dei tumori spontanei nei mammiferi marini, come nelle altre specie, è sconosciuta.

Le uniche neoplasie polmonari descritte in letteratura sono: condroma polmonare (De Guise, 1994) in beluga, reticoloendoteliosi polmonare in *T. truncatus* (Landy, 1980).

1.9 Fisiopatologia dell'apparato respiratorio: peculiarità dei cetacei

In condizioni normali l'organismo elimina le tossine, intrappola e rimuove le particelle di materiale esogeno, blocca, distrugge e rimuove i microorganismi dal sistema respiratorio.

I principali meccanismi di difesa contro il particolato esogeno inalato ma, soprattutto contro i batteri, sono:

- Filtrazione meccanica dell'aria ad opera di sacchi aerei, tonsilla laringea (descritta nella parte dell'anatomia dell'apparato respiratorio degli odontoceti), biforcazione bronchiale, turbolenze, adesione al muco, tosse.
- Clearance muco-ciliare operata dal sistema di conduzione (sfintatoio, trachea e mucosa bronchiale). Le ciglia sono presenti lungo tutto il tratto respiratorio di conduzione. In letteratura esistono descrizioni delle ghiandole mucose nel tratto respiratorio degli odontoceti, con la peculiarità di essere numericamente inferiori, se non assenti, rispetto a quelle dei mammiferi terrestri; lo stesso vale per le cellule mucipare della mucosa respiratoria (Ridgway, 1972). Ciò è probabilmente dovuto alla minor quantità di particolato presente nell'ambiente in cui vivono.

Esiste solo una segnalazione che descrive abbondanti ghiandole mucose nella trachea e nei bronchi di un tursiopo dell'Atlantico (Ridgway, 1972).

- Fagocitosi da parte dei macrofagi a livello di sistema di scambio alveolare
- Immunità innata o acquisita (anticorpi e immunità cellulo-mediata). In uno studio di Shiraishi *et al.* (2002) si evidenzia che la risposta neutrofilica (scoppio respiratorio) dei tursiopi rispetto a umani e ruminanti, in seguito a stimolazione da agenti batterici, risulta essere inferiore. Si ipotizzò che ciò dipendesse dalla differenza di habitat (agenti estranei differenti). Il BALT (bronchial associated lymphoid tissue) dei cetacei è descritto come aggregati linfoidi disseminati, in assenza di organizzazione nodulare (Ridgway, 1972), ad eccezione di un singolo nodulo osservato in un capodoglio (*Physeter macrocephalus* (Ridgway, 1972)). La letteratura riguardante lo sviluppo e la struttura del sistema linfatico nei cetacei risulta frammentaria e scarsa, a parte rare eccezioni (Simpson *et Gardner* 1972, Romano *et al.* 1993).

Cowan *et Smith*, 1999 hanno cercato di uniformare, limitati dalle ovvie differenze strutturali,

il linguaggio descrittivo dei gruppi linfonodali dei cetacei alla Nomina Anatomica Veterinaria (NAV).

Tre gruppi di linfonodi sono costantemente associati al sistema respiratorio: i linfonodi del margine anteriore libero (organizzati in una massa triangolare ventrale bilaterale e localizzati nel punto di contatto con il diaframma), i diaframmatici (tessuto linfoide a forma di “U” adesi alla faccia diaframmatica del polmone a al diaframma) e gli ilari (localizzati nel punto di immissione del bronco principale nel polmone). I linfonodi marginali e diaframmatici sono i principali responsabili del drenaggio polmonare.

Nei tursiopi esiste una grande varietà individuale per cui in alcuni animali i gruppi linfonodali sono formati da unità distinte, mentre in altri sono fusi a formare una massa lobulare irregolare (Cowan *et* Smith, 1999). Microscopicamente la capsula dei linfonodi è spessa e dotata di scarse fibre di muscolatura liscia (Vukovic *et al.*, 2005; Cowan *et* Smith, 1999) e l’anatomia interna è comparabile a quella dei mammiferi terrestri a parte un caso di stenella striata, dei delfini comuni (*Delphinus delphi*) e delle focene (*Phocoena phocoena*), in cui l’anatomia della corteccia e della midollare risulta invertita (i follicoli linfoidi sono posizionati centralmente) (Vukovic *et al.*, 2005).

I suddetti meccanismi sono abbastanza efficienti nell’eliminazione dei batteri inalati. Nel caso questi fallissero, i batteri sono in grado di colonizzare il polmone e provocare una polmonite batterica. Esistono molti fattori che possono danneggiare o indebolire i meccanismi di difesa tra cui: infezioni virali, immunodeficienza, stress, disidratazione, edema polmonare, uremia, inalazione di ammoniaca.

1.10 Macrofagi polmonari

I patogeni presenti nel flusso sanguigno (batteri e endotossine, vecchi eritrociti, detriti cellulari) vengono rapidamente rimossi dai macrofagi. Secondo la teoria del sistema fagocitico-mononucleato (MPS), macrofagi e cellule mononucleate derivano dal midollo osseo, sono tipi cellulari residenti in contatto con il sistema circolatorio sanguigno e giocano un ruolo importante nelle difese dell’ospite (Brain *et al.*, 1999; Winkler, 1988) macrofagi che si ritrovano nei polmoni sono di tre tipi: i macrofagi alveolari, gli interstiziali polmonari

e i macrofagi intra-vascolari polmonari (PIM).

I macrofagi alveolari sono stati osservati nel lume alveolare. Nei cetacei presentano caratteristiche morfologiche tipiche dei macrofagi maturi, quindi con un endocitosi ben sviluppata.

I macrofagi interstiziali polmonari dei cetacei si possono osservare nell'interstizio, al di sotto dell'epitelio bronchiolare, hanno forma affusolata e sono diffusamente distribuiti. Alcuni dei macrofagi interstiziali possono presentarsi con citoplasma aumentato e contenente particelle nerastre, apparentemente particelle di carbonio o pigmenti verde-giallo (lipofuscina o ceroidi) o entrambi; queste cellule si osservano soprattutto attorno ai piccoli vasi linfatici e, a volte, in associazione a infiltrati plasmocitari e linfocitari; si ritiene derivino dai macrofagi alveolari che si sono trasferiti nell'interstizio dal lume alveolare (Kawashima *et al.*, 2004).

I PIM sono stati osservati nei capillari polmonari a diretto contatto con la membrana basale dei capillari. Sono stati descritti, nell'ordine degli artiodattili (Bovini, Caprini, Ovini, Cervidi e Suini), nell'ordine dei Perissodattili (Cavalli e Asini) e gatti e, recentemente, nei cetacei (Brain *et al.*, 1999). All'osservazione con il ME si presentano rotondeggianti, elissoidali, mononucleati e di forma irregolare, con un diametro di 10-20 μm . All'interno del citoplasma le strutture che meglio si distinguono sono invaginazioni tubulari da pinocitosi attiva, conosciute come strutture vermiformi di micropinocitosi tubulare. La superficie cellulare è coperta da una lamella elettrondensa (glicocalice). Nel citoplasma si osservano frequentemente fagosomi e lisosomi; alcuni fagosomi contengono eritrociti degradati; occasionalmente i lisosomi contengono dense particelle riferibili a siderosomi. I PIM sono in stretta connessione, attraverso giunzioni cellulari, con quelle cellule endoteliali localizzate all'interno dei setti interalveolari di collagene. La presenza di queste strutture sottili permette di distinguere chiaramente i PIM da monociti e granulociti sanguigni.

La distribuzione e la morfologia dei PIM dei cetacei sono sovrapponibili a quelle osservate nei mammiferi terrestri. I macrofagi in contatto con il sistema circolatorio giocano un ruolo importante nella clearance delle particelle disciolte nel sangue. È stato osservato che, nei cetacei, le particelle vengono rapidamente rimosse dai PIM, più che dalle cellule di Kupffer del fegato (Brain *et al.*, 1999; Warner *et al.*, 1986). Sebbene alcuni dei loro effetti siano

positivi, l'azione dei PIM produce anche effetti lesivi nell'ospite, in particolare in presenza di tossine circolanti derivanti da batteri gram negativi: i macrofagi, infatti, nell'attivarsi, fagocitano l'endotossina e possono indurre un danno polmonare attraverso il rilascio di mediatori dell'infiammazione (Chen *et al.*, 2003; DeCamp *et al.*, 1992; Gaca *et al.*, 2003). Proprio nei cetacei, i PIM giocano probabilmente un ruolo significativo nell'induzione e nella progressione di lesioni polmonari infettive fatali (Kawashima *et al.*, 2004).

Quando la risposta infiammatoria acuta non è sufficiente a garantire il ritorno del tessuto alla sua normale struttura e funzione, può evolversi in un processo cronico o in infiammazione granulomatosa, in una risposta fibrotica o, infine, in formazione di ascessi.

L'infiammazione cronica/granulomatosa si scatena in presenza di stimolo dannoso persistente, danno e necrosi tissutale estesi, shift degli elementi cellulari della risposta infiammatoria da neutrofili a linfociti, macrofagi e a volte cellule giganti multinucleate, e/o, infine, riorganizzazione del tessuto connettivo seguito da fibrosi. Gli agenti eziologici implicati in questo tipo di risposta sono miceti, batteri, protozoi, parassiti, corpi estranei.

L'instaurarsi della risposta fibrotica è segnata dal danno necrotico alla componente strutturale del tessuto; i macrofagi si adoperano per rimuovere il tessuto necrotico e l'essudato dell'infiammazione acuta; il tutto viene poi sostituito da tessuto di granulazione. Se quest'ultimo viene rimpiazzato da connettivo fibroso si ha la formazione della cicatrice con ritorno all'integrità strutturale, ma non funzionale, del tessuto di partenza.

1.11 Classificazione anatomopatologica delle lesioni dell'apparato respiratorio in medicina veterinaria

In anatomia patologica veterinaria, una delle possibili modalità di distinzione delle lesioni polmonari si basa sulla componente interessata e colpita e del tipo di processo patologico che interessa il tessuto polmonare. In particolare, è possibile distinguere lesioni connesse ad anomalie del contenuto d'aria, alterazioni circolatorie, lesioni vascolari e flogosi delle vie aeree e del parenchima polmonare. Di seguito vengono brevemente descritte.

1.11.1 Anomalie del contenuto d'aria

Un normale rapporto ventilazione perfusione garantisce gli scambi gassosi tra alveoli e capillari polmonari. Questo rapporto viene alterato in caso di atelettasia o enfisema.

L'atelettasia si definisce come incompleta distensione (parziale o totale) polmonare. Può presentarsi in due forme: congenita o acquisita; nel primo caso, per ostruzione delle vie aeree (sindrome di aspirazione del meconio o MAS) o per insufficienza del surfactante polmonare ((Respiratory Distress Syndrome/Hyaline membrane disease), il polmone non riesce a distendersi alla nascita e quindi a funzionare correttamente. In questo caso l'atelettasia si può presentare sottoforma di quadri gravi o forme localizzate. L'atelettasia acquisita, invece, si verifica in caso di ostruzione delle vie aeree per la presenza di essudato, parassiti o materiale alimentare, o per compressione da parte di masse intratoraciche come ascessi, tumori, pericarditi e traumi esterni. In entrambi i casi, macroscopicamente i polmoni si presentano come nel feto: collassati, scuri, compatti alla palpazione (come nella polmonite) e non galleggiano (docimasia negativa). Microscopicamente gli alveoli sono collassati con perdita degli spazi alveolari. Nella forma congenita gli alveoli si presentano distesi con alveolociti rotondeggianti e contenenti liquido amniotico, cellule epiteliali di sfaldamento delle vie aeree e meconio (tentativi respiratori).

L'enfisema rappresenta un'anormale e permanente distensione degli spazi aerei che interessa i bronchioli terminali e distali, fino a provocare la rottura delle pareti alveolari in assenza di fibrosi. Negli animali è una condizione secondaria a vari tipi di lesioni polmonari. I principali tipi di enfisema negli animali sono:

- Enfisema alveolare: di difficile valutazione alla necropsia o al M.O., se moderato,

a meno che non si usino tecniche che prevengono il collasso polmonare all'apertura del torace. Nelle forme gravi il polmone si presenta aumentato di volume, con consistenza diminuita e colore più chiaro (impronta delle coste) con occasionale presenza di vere e proprie bolle d'aria.

- Enfisema interstiziale: è caratterizzato dalla presenza di aria nel tessuto connettivo e nei linfatici del polmone dovuta a violenti tentativi respiratori. Le forme più gravi si osservano associate alla polmonite interstiziale acuta, nella quale i movimenti espiratori forzano l'aria nei setti interlobulari a causa del collassamento dei bronchioli respiratori. L'aria, attraverso i linfatici, può arrivare ai linfonodi e alla cute (pneumoderma).
- Enfisema bolloso: è un consistente accumulo gassoso focale nel polmone causato dalla rottura del tessuto polmonare.

1.11.2 Disturbi circolatori del polmone

Il polmone è un organo dotato di doppia circolazione proveniente da arterie bronchiali e polmonari. Disturbi circolatori si ripercuotono sugli scambi gassosi provocando, in alcuni casi, ipossiemia e acidosi. Inoltre, disturbi polmonari possono ripercuotersi su altri organi come cuore e fegato. Ad esempio un flusso di sangue ostacolato a causa di problemi polmonari cronici può esitare in un cor pulmonale, provocato da ipertensione polmonare seguita da dilatazione cardiaca, insufficienza cardiaca destra, congestione epatica cronica passiva (fegato a noce moscata) e edema generalizzato (anasarca).

L'iperemia è un processo attivo facente parte dell'infiammazione acuta. Negli stadi acuti, il polmone assume un aspetto pesante e una colorazione rossa e, microscopicamente, i mediatori dell'infiammazione provocano vasodilatazione e essudazione. Alla superficie di taglio si ha fuoriuscita di sangue.

La congestione è un processo passivo, spesso associato a insufficienza cardiaca congestizia (sinistra, non compensata). Può progredire e provocare edema polmonare ed emorragie intralveolari con eritrofagocitosi (heart failure cells). Quando questa fuoriuscita è severa si accumulano un gran numero di macrofagi con citoplasma marrone (emosiderina) negli spazi broncoalveolari; quest'ultimi, anche chiamati siderofagi, vengono identificati come

le cellule indicative di insufficienza cardiaca. I polmoni dei soggetti affetti da insufficienza cardiaca cronica hanno una colorazione rossa irregolare, con foci di color marroncino date dall'accumulo di emosiderina. Nei casi gravi e cronici di insufficienza cardiaca il polmone non collassa all'apertura per la presenza di edema e fibrosi polmonare.

L'emorragia polmonare riconosce diverse eziologie: insufficienza cardiaca, trauma da fratture costali o ferite penetranti, coagulopatie, trombocitopenia immunomediata, tromboembolismi in caso di setticemia, DIC, parassiti in circolo, rottura di vasi in caso di aneurismi polmonari, erosione di pareti vascolari da ascessi. Macroscopicamente le emorragie hanno dimensioni variabili e vanno da petecchie a aree focalmente estese di colorazione rossastra. Microscopicamente nelle emorragie polmonari si reperta la caratteristica presenza di siderofagi.

I polmoni, dato il loro ampio letto capillare, sono sito frequente di tromboembolismi, emboli settici, lipidici e neoplastici; raramente sono in grado di causare infarto grazie alla caratteristica doppia circolazione polmonare; sono osservabili negli stati di ipercoagulabilità, stasi ematica, danno alle cellule endoteliali. I piccoli tromboembolismi, se sterili, vengono eliminati dal sistema fibrinolitico.

Gli emboli settici, contaminati con batteri o funghi, si staccano da trombi murali o valvolari localizzati nel cuore e nei vasi. Se presenti in gran numero, gli emboli settici possono causare morte inaspettata a causa di edema polmonare massivo; gli animali che sopravvivono possono sviluppare arterite, trombosi e polmonite embolica che può condurre ad ascessi polmonari. Gli embolismi lipidici sono poco frequenti e possono originare da fratture con esposizione del midollo osseo o da rotture epatiche da steatosi. Gli emboli neoplastici possono essere evidenti, numerosi e causa ultima di morte nelle neoplasie maligne.

L'infarto polmonare è un'evenienza poco frequente grazie al doppio apporto arterioso polmonare. Le caratteristiche macroscopiche dell'infarto variano in relazione allo stadio: il colore va dal rosso al nero, possono essere protuberanti, compatti, a forma di cono o di triangolo, generalmente ai margini polmonari. Nelle fasi acute le lesioni microscopiche consistono in severe emorragie seguite da necrosi. Entro 1 o 2 giorni si sviluppa una risposta infiammatoria e alcuni giorni dopo un gran numero di siderofagi occupa la porzione necrotica. Se sterile, l'infarto si risolve con una cicatrice fibrotica; se settico, l'ascesso

viene isolato da una spessa capsula connettivale. Generalmente gli infarti polmonari non costituiscono un pericolo per la vita del soggetto, ma possono dar vita a una polmonite embolica.

In un polmone sano i fluidi passano lentamente e continuamente dagli spazi vascolari al tessuto interstiziale, dove vengono rapidamente drenati dal sistema linfatico polmonare e pleurico. Le cause di edema possono essere:

- un aumento della pressione idrostatica (edema cardiogeno) negli animali con insufficienza cardiaca sinistra (edema a basso contenuto proteico) o eccesso di fluidi (iatrogenico). L'edema può avere anche un'origine neurogena dovuto a grave danno cerebrale;
- un aumento della permeabilità vascolare: si verifica in caso di danno alla barriera sangue-aria, in caso di infiammazioni, pancreatiti, sepsi, DIC, shock anafilattico, allergia al latte, tossicità da paraquat e reazioni avverse a farmaci. I fluidi o tipo di edema presentano un alto contenuto proteico;
- un'ostruzione del drenaggio linfatico: in caso di neoplasie che coinvolgono linfonodi o vasi linfatici toracici. In questo caso i fluidi presentano un basso contenuto proteico.

In medicina umana l'edema cardiogeno viene differenziato dal non cardiogeno proprio grazie al fatto che il primo produce trasudato, mentre il secondo essudato. Macroscopicamente si rileva la presenza di liquido schiumoso nelle vie aeree, in assenza di questo non è possibile fare diagnosi di edema polmonare come causa definitiva di morte. Il polmone appare umido, pesante e non collassa all'apertura del torace; il colore può variare in relazione alla concomitanza di fenomeni emorragici. Importante sottolineare il fatto che un edema polmonare acuto può somigliare a processi infiammatori, soprattutto se interstiziali, iperacuti.

Istologicamente il fluido edematoso si presenta acidofilo, omogeneo o leggermente granuloso ed è presente negli alveoli e nel tessuto interstiziale. La quantità di proteine è bassa nelle forme cardiogene per cui il liquido è meno prominente. Le forme provocate da alterazioni della permeabilità presentano una maggior quantità di proteine, con la presenza spesso di piccole quantità di fibrina. A causa della distensione delle pareti alveolari i

fenomeni emorragici sono frequenti e possono essere dimostrati con la presenza di globuli rossi o emosiderina nei macrofagi alveolari. Le forme cardiogene sono spesso associate ad ipertrofie delle cellule muscolari lisce dei piccoli vasi arteriosi e fibrosi della parete alveolare. I vasi linfatici si presentano ectasici a testimonianza dello sforzo di drenare l'eccesso di fluidi. Sono stati riconosciuti due stadi di edema: il primo è l'edema interstiziale ed è caratterizzato da congestione del tessuto interstiziale perivascolare e peribronchiale. Il secondo stadio è caratterizzato dal passaggio di fluidi negli alveoli ed è chiamato edema alveolare.

L'ipertensione polmonare può derivare da aumento della pressione atriale sinistra (stenosi mitralica, insufficienza ventricolare sinistra), aumento del flusso ematico polmonare (malformazioni cardiache con shunt sinistra-destra) o da incremento delle resistenze vascolari polmonari (da vasocostrizione secondaria a ipossia polmonare, da ostruzione vascolare come nell'embolia o nelle forme di obliterazione vascolare come nelle arteriti da enfisema o da *Angiostrongylus sp.*). Da un punto di vista fisiopatologico, perché si instauri una ipertensione arteriosa, quasi la metà del circolo polmonare deve essere occluso. Istologicamente si osservano iperplasia delle fibre muscolari lisce bronchiolari e perialveolari e delle piccole arteriole. Nelle forme più gravi si osserva degenerazione endoteliale e fibroplasia.

1.12 Classificazione delle polmoniti

Non esiste una classificazione universale delle polmoniti in medicina veterinaria; esistono diversi tipi di classificazioni in base a eziologia, epidemiologia, essudato e distribuzione.

Lopez A. nel suo articolo "*Pathology of the respiratory system*" del 2007 propone una classificazione basata su tipo di essudato, trama del tessuto e via di entrata dell'agente eziologico. Riportiamo qui sotto la classificazione sulla base dell'essudato e sulla distribuzione delle lesioni infiammatorie, che risulta applicabile sulla base dei reperti patologici.

Broncopolmonite suppurativa (Polmonite lobare): la distribuzione è cranio ventrale, le aree interessate sono consolidate, risultano da insulti aerogeni. I batteri e i micoplasmi

rappresentano le cause più importanti delle forme cliniche. La morte può avvenire quando l'interessamento polmonare supera il 60%. Macroscopicamente si evidenzia un irregolare consolidamento delle regioni cranio-ventrali con colorito variabile da rosso scuro (fase acuta, iperemia) a grigiastro (infiammazione cronica, atelettasia, fibrosi) e coinvolgimento variabile delle pleure. Alla superficie di taglio si osserva fuoriuscita di essudato (catarro, pus) o aspetto duro e secco (forme fibrinose); nelle forme croniche l'essudato assume un aspetto mucoide. Istologicamente, nelle forme acute, troviamo abbondanti leucociti polimorfonucleati negli spazi broncoalveolari, mentre nelle fasi croniche troviamo PMN, PAM e muco (iperplasia cellule caliciformi). Conseguenze comuni della broncopolmonite sono: ascessi, bronchiectasia, fibrosi e adesioni pleuriche dei lobi cranioventrali.

Broncopolmonite fibrinosa (polmonite fibrinosa o polmonite lobare): viene considerata una forma iperacuta e generalmente fatale. Macroscopicamente osservo consolidamento uniforme e diffuso di interi lobi cranioventrali. Alla superficie di taglio gli stadi precoci appaiono come singoli consolidamenti rossi; negli stadi più avanzati si accompagna a notevole dilatazione e trombosi dei vasi linfatici e edema dei setti interlobulari, il che dà un tipico aspetto marmorizzato. Sono frequenti anche distinte aree focali di necrosi coagulativa nel parenchima polmonare. Negli animali che sopravvivono agli stadi iniziali, la necrosi polmonare spesso si trasforma in sequestri polmonari che sono parti isolate di polmone necrotico incapsulate da tessuto connettivo. I sequestri sono il risultato di estese necrosi causate a loro volta da gravi ischemie o da tossine necrotizzanti rilasciate dai batteri patogeni. Da un punto di vista patogenetico si tratta di flogosi broncopolmonari rapidamente confluenti in cui non vi sono evidenze macroscopiche di diffusione bronchiale che riconoscono quindi gli stessi fattori delle broncopolmoniti e hanno la stessa via di entrata. Queste lesioni fulminanti sono causate primariamente da alcuni batteri come *Pasteurella*, *A. pleuropneumoniae*, *Mycoplasma mycoides*, *Streptococcus sp.* o da aspirazione di materiale liquido (natura del materiale, tipo di batterio implicato, distribuzione del materiale nel polmone).

Polmonite interstiziale (pneumonite): è un particolare tipo di polmonite in cui il danno e il processo infiammatorio si localizzano primariamente in ognuno dei tre strati che compongono la parete alveolare: endotelio, membrana basale, epitelio alveolare e

l'adiacente interstizio bronchiolare. È la polmonite più difficile da riconoscere alla necropsia e generalmente richiede conferma microscopica. La patogenesi è complessa e può derivare da un danno aerogeno all'epitelio alveolare (inalazione di gas tossici come ozono e NO₂, fumi tossici), infezione con virus pneumotropi (influenza, MV) in assenza di infezioni batteriche secondarie), da un danno ematogeno all'endotelio dei capillari alveolari (setticemia, DIC, microembolismi, larva migrans circolanti), tossine assorbite tramite il tratto alimentare (endotossine), da metaboliti tossici localmente generati nel polmone (3 metilindolo, paraquat), dal rilascio di radicali liberi nei capillari alveolari, dall'infezione con virus endoteliotropi (*Adenovirus canino* e febbre suina classica) o alla membrana basale alveolare. Inoltre i danni alla parete alveolare possono verificarsi all'inalazione di antigeni, come spore fungine, che combinandosi con gli Ab circolanti formano complessi antigene-anticorpo (ipersensibilità di tipo III) nelle pareti alveolari, il che dà il via a una cascata di risposte infiammatorie e danni (alveolite allergica). Macroscopicamente sono caratterizzate da distribuzione diffusa, mancato collasso del polmone all'apertura del torace e occasionale impronta costale sulla superficie pleurica. Il colore dipende da estensione della lesione, tipo di essudato e tessuto fibrotico cicatriziale. La polmonite interstiziale è spesso accompagnata da edema, enfisema o broncopolmonite (polmonite bronco interstiziale). Istologicamente la lesione principale consiste nell'ispessimento delle pareti alveolari; in secondo luogo essudato interstiziale o proliferazione dei pneumociti di II tipo. Nelle polmoniti interstiziali croniche troviamo fibrosi alveolare. Il termine polmonite bronco-interstiziale, in medicina veterinaria, è correntemente utilizzato per descrivere le lesioni microscopiche causate dalle polmoniti di origine virale. Alcuni virus respiratori causano necrosi e infiammazione dell'epitelio bronchiale e bronchiolare (broncopolmonite) e anche necrosi interstiziale e proliferazione dei pneumociti (polmonite interstiziale). A maggior parte delle polmoniti virali è transiente a meno che non venga complicata da infezioni batteriche secondarie.

Polmonite embolica: si riferisce ad un particolare tipo di polmonite, tipicamente batterica o fungina in cui il danno è ematogeno e la risposta infiammatoria è centrata sulle arteriole polmonari e capillari alveolari. Trombi settici, a causa della loro misura, facilitano l'intrappolamento di batteri all'interno dei vasi polmonari e creano un ambiente favorevole per sfuggire alla fagocitosi. Una volta intrappolati nei vasi polmonari, di solito

in piccole arteriole o capillari alveolari, i batteri danneggiano endotelio e membrana basale diffondendosi dai vasi all'interstizio e successivamente al polmone circostante, dando vita infine ad un nuovo sito di infezione. Macroscopicamente si rinvengono foci multiple o singoli noduli focali disseminati caratterizzati da un centro biancastro circondato da margini emorragici. In alcuni casi le lesioni emboliche possono progredire in formazione di ascessi. Il colore varia in base alla quantità di tessuto connettivo e vasi sanguigni. Alla palpazione si percepisce una tessitura nodulare. Istologicamente è caratterizzata dalla presenza i emboli settici adesi ai capillari polmonari, edema polmonare e microascessi.

Polmonite granulomatosa: tipo di polmonite in cui i danni ematogeni e aerogeni sono causati da organismi resistenti ai macrofagi e alla risposta infiammatoria acuta e persistono nel tessuto infetto a lungo (malattie micotiche sistemiche: Cryptococcosi, histoplasmosi, blastomycosi; malattie batteriche come la tubercolosi; alcuni parassiti) o particelle che non possono essere normalmente eliminate per fagocitosi e che scatenano una risposta infiammatoria con numerosi macrofagi alveolari e interstiziali, linfociti, pochi neutrofilo e a volte cellule giganti. Macroscopicamente si osservano granulomi nel polmone e occasionalmente in altri organi. Alla palpazione il polmone presenta un aspetto tipicamente nodulare e solido soprattutto se si sono formate calcificazioni. Istologicamente è caratterizzato da noduli di diverse dimensioni: si riconosce un centro necrotico con infiltrazione di macrofagi e cellule giganti multinucleate, circondato da una capsula di tessuto connettivo accompagnato da infiltrato linfo-plasmacellulare. All'esame post mortem i granulomi possono essere confusi con formazioni neoplastiche.

2. SCOPO

Negli ultimi anni lo spiaggiamento dei cetacei ha stimolato una crescente attenzione del mondo veterinario, interessato a conoscere i problemi sanitari di queste specie, i meccanismi fisiologici e patologici di adattamento al mondo marino e l'impatto delle attività antropiche sulla conservazione di queste specie. Questa attività ha dato vita



alla creazione della Banca per i Tessuti dei Mammiferi Marini del Mediterraneo, su direttiva dell'accordo ACCOBAMS. La Banca ha come missione quella di raccogliere e distribuire alle istituzioni scientifiche i tessuti di cetacei, in collaborazione con l'Unità di Intervento

per la Necropsia dei Cetacei che assicura le indagini post-mortem su questi animali.

Sulla base di molti studi eseguiti su animali spiaggiati in vari bacini, che indicano il polmone come sito in cui si riscontrano più frequentemente lesioni nei mammiferi marini, con il presente lavoro si vuole indagare sui quadri patologici presenti nei tessuti di polmone conservati nella Banca, confrontando due specie (*Stenella coeruleoalba* e *Tursiops truncatus*) e le specie a vita libera con tursiopi mantenuti in ambiente controllato.

In particolare si cercherà di valutare quali siano i pattern della risposta infiammatoria nel tessuto polmonare relazionandoli ai diversi agenti eziologici e segnalando eventuali differenze esistenti tra il Mar Adriatico ed il Mar Tirreno. Inoltre si vuole tentare di uniformare le classificazioni morfologiche utilizzando quelle più recenti della medicina veterinaria tradizionale. Nel corso dell'indagine, infine, saranno segnalati tutti i reperti più frequenti e quelli più particolari, fisiologici e patologici, cercando di contribuire alla scarsa letteratura presente ed arricchendo quindi le conoscenze sulla patologia dei cetacei.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Individuazione dei campioni

I campioni di materiale utilizzati in questo studio provengono dalla Banca Italiana Tessuti (BIT o MMBT), che ha sede presso il Dipartimento di Scienze Sperimentali Veterinarie della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Padova.



La Banca per i Tessuti dei Mammiferi Marini del Mediterraneo raccoglie principalmente tessuti provenienti da cetacei spiaggiati lungo le coste italiane del Mediterraneo e delle aree adiacenti e, a partire dal 2 ottobre 2000, tessuti di mammiferi marini mediterranei e non, provenienti da ambienti controllati. La Banca è stata ufficialmente riconosciuta e

finanziata dal Ministero dell'Ambiente Italiano e inserito nell'accordo ACCOBAMS. I tessuti preparati e conservati nella BIT sono accessibili a tutti coloro che ne necessitano su motivata richiesta scientifica.

Nella BIT la ricerca dei campioni si effettua attraverso un software inserendo diversi codici di riconoscimento per il singolo campione, esemplare, organo, specie, provenienza o per la modalità di conservazione (congelato o in formalina).

Dopo aver stilato una lista di tutti i tursiopi (*Tursiops truncatus*), sia a vita libera (Tab. 3.1) sia in ambiente controllato (Tab. 3.2), e delle stenelle (*Stenella coeruleoalba*) (Tab. 3.3) presenti, sono stati prelevati dalla Banca Tessuti i campioni interessati; questi potevano essere conservati in formalina o già inclusi in paraffina solida. Gli esemplari giunti alla Banca come animali interi (segnalati in tabella 3.1, 3.2, 3.3 tramite *) sono stati sottoposti ad esame necroscopico da parte di patologi veterinari del Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria dell'Università di Padova, che da tempo collaborano con la BIT. Lo stato di conservazione di ogni carcassa è stato valutato sulla base dei dati riportati in tabella 3.4.

I dati utilizzati in questa tesi, relativi all'esame necroscopico e agli esami collaterali dei soggetti interi pervenuti prima del 2007, sono stati raccolti dagli archivi del Dipartimento di Scienze Sperimentali Veterinarie della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Padova. Dal 2007 al 2009 ho potuto partecipare personalmente all'esecuzione delle indagini post mortem (dati necroscopici, iconografici ed esami collaterali) nei soggetti spiaggiati.

Tabella 3.1: *Tursiops truncatus* da ambiente controllato della BIT campionati

ID esemplare	Provenienza	Data	Sesso	Stato
4	Ambiente Controllato	07/09/00	F	2
9 *	Ambiente Controllato	01/06/01	F	2
18	Ambiente Controllato	17/10/01	M	2
20 *	Ambiente Controllato	23/02/02	F	1
89 *	Ambiente Controllato	12/10/05	M	2
102	Ambiente Controllato	10/07/06	M	1
107 *	Ambiente Controllato	11/09/06	M	Sconosciuto
114 *	Ambiente Controllato	18/06/07	M	2
123 *	Ambiente Controllato	30/08/07	F	1
124 *	Ambiente Controllato	06/09/07	M	1
133 *	Ambiente Controllato	19/01/08	F	1
139 *	Ambiente Controllato	15/02/08	M	Sconosciuto
144 *	Ambiente Controllato	15/10/08	M	1
145 *	Ambiente Controllato	17/10/08	M	1
146 *	Ambiente Controllato	18/10/08	M	1
159	Ambiente Controllato	13/02/09	M	1

* soggetti interi

Tabella 3.2: *Tursiops truncatus* a vita libera della BIT campionati

ID esemplare	Provenienza	Data	Sesso	Stato
2 *	Adriatic Sea / Jesolo	02/10/00	F	Sconosciuto
36	Isola di Caprera	14/08/02	F	2
55	Adriatic sea	08/12/02	F	1
88 *	Marina di Monte Marciano (AN)	08/08/05	F	1
94	Pellestrina (VE)	12/12/05	Nd	3
95 *	Jesolo (VE)	05/03/06	F	2
96	Jesolo (VE)	05/03/06	M	Sconosciuto
100 *	Cervia (RA)	24/04/06	M	1
110 *	Porto Tolle (RO)	14/11/06	M	3
127	Napoli	29/08/07	M	2
142 *	Jesolo (VE)	23/06/08	F	2
147	Pontecagnano (SA)	27/10/08	M	Sconosciuto
162 *	Comacchio	14/07/09	M	2
163 *	Jesolo (VE)	16/07/09	M	4
164 *	Porto Garibaldi	27/07/09	M	2
165 *	Lido Adriano (RA)	27/07/09	M	2

* soggetti interi

Tabella 3.3: *Stenella coeruleoalba* della BIT campionati

ID esemplare	Provenienza	Data	Sesso	Stato
6 *	Abruzzo-Molise	15/02/01	M	2
7 *	Chioggia (VE)	13/03/01	M	3
12 *	Mar Tirreno	09/12/01	M	2
16 *	Mar Adriatico	2002	F	Sconosciuto
21	Mar Tirreno	29/01/02	F	3
22	Imperia	15/10/01	F	3
23	Mar Tirreno Settentrionale	08/02/02	M	Sconosciuto
25 *	Mar Tirreno	22/01/02	F	1
26	Mar Adriatico	11/03/02	F	3
30	Borgo Prino (IM)	05/05/02	F	1
33	Vulcano (ME)	16/07/02	M	1
34 *	Lido di Camaiore (LU)	25/07/02	F	1
38 *	Sanremo	25/08/02	Nd	4
39	San Lorenzo al Mare (IM)	17/09/02	F	3
40	Foce Torrente Caramagna (IM)	23/10/02	Nd	Sconosciuto
42	Riva Ligure-Imperia	05/07/03	M	4
44	Sardegna	04/03/03	F	1
45	Mar Tirreno Settentrionale	05/06/03	F	1
49 *	Lavagna (GE)	16/09/03	M	1
58	Sanremo, Capo Pino	16/02/04	F	3
85	Cupra Marittima (AP)	12/04/05	F	Sconosciuto
92	Cervo (IM)	22/03/05	M	3
97	Orbetello (GR)	01/03/06	F	4
98	Rosignano (LI)	22/03/06	F	4
122	Monaco	22/06/06	F	3
132	Mazara del Vallo (TP)	25/09/07	M	2
140	Imperia	13/01/08	M	Sconosciuto
161 *	Orbetello (GR)	04/06/09	M	1

* soggetti interi

3.2 Suddivisione dei soggetti in funzione delle aree marine

Il Centro di Coordinamento per la raccolta dei dati sugli spiaggiamenti di mammiferi marini (Università degli Studi di Pavia) mette a disposizione una mappatura delle acque italiane che propone una suddivisione in aree marine funzionale al chiarimento della localizzazione dei fenomeni di spiaggiamento. I mari italiani e le coste da essi lambite sono stati così ripartiti:

- | | | | |
|--------------------------|----|----------------------------|-----|
| • Mar Ligure | ML | • Canale di Sicilia | CSi |
| • Tirreno settentrionale | TS | • Ionio meridionale | IM |
| • Mar di Sardegna | MS | • Ionio settentrionale | IS |
| • Tirreno centrale | TC | • Adriatico meridionale | AM |
| • Tirreno meridionale | TM | • Adriatico centrale | AC |
| • Canale di Sardegna | CS | • Adriatico settentrionale | AS |

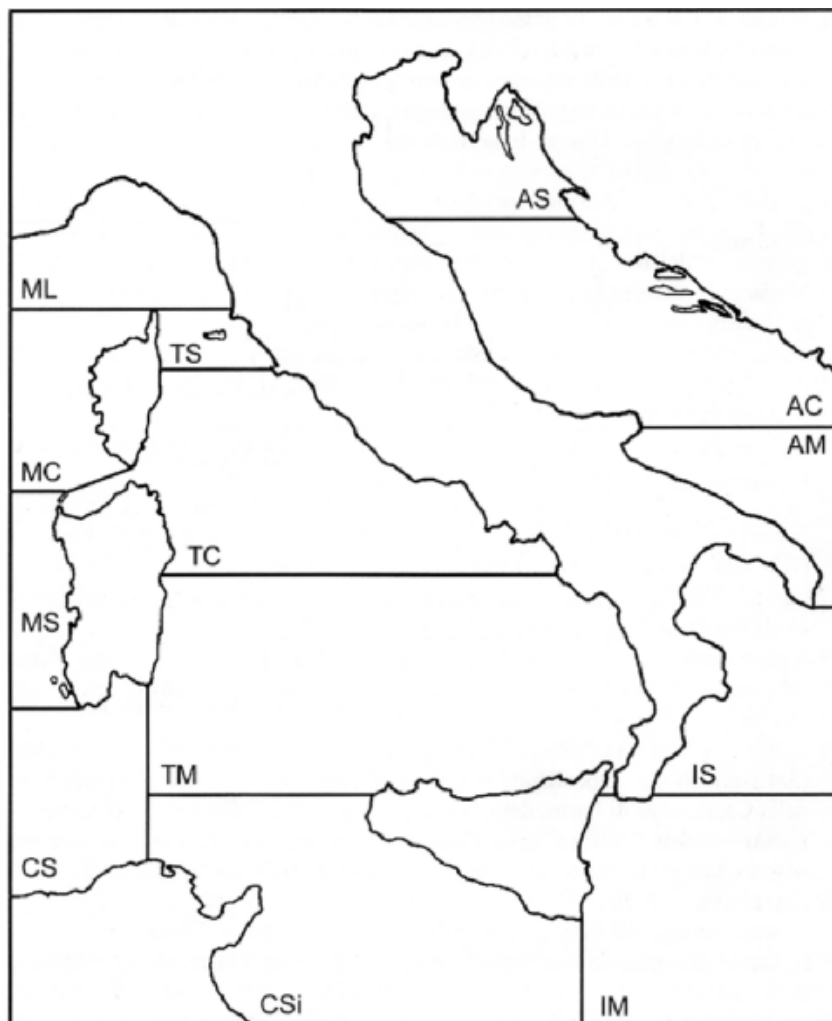


Figura 3.1: suddivisione dei mari italiani in aree marine

La mappa sopra indicata ci ha permesso non solo di suddividere i soggetti a vita libera (sia i tursiopi, sia le stenelle) a seconda delle aree marine, ma ci ha anche consentito di visualizzare l'entità e la distribuzione degli spiaggiamenti negli anni compresi tra il 2000 e il 2009; in un secondo momento ha poi favorito l'elaborazione dei dati e la formulazione di correlazioni tra luogo di spiaggiamento e altri fattori quali le parassitosi, l'antracosi, le zoonosi, i traumi da collisione, ecc.



Figura 3.2: distribuzione degli spiaggiamenti di *Tursiops truncatus* sulle coste italiane dal 2000 al 2009

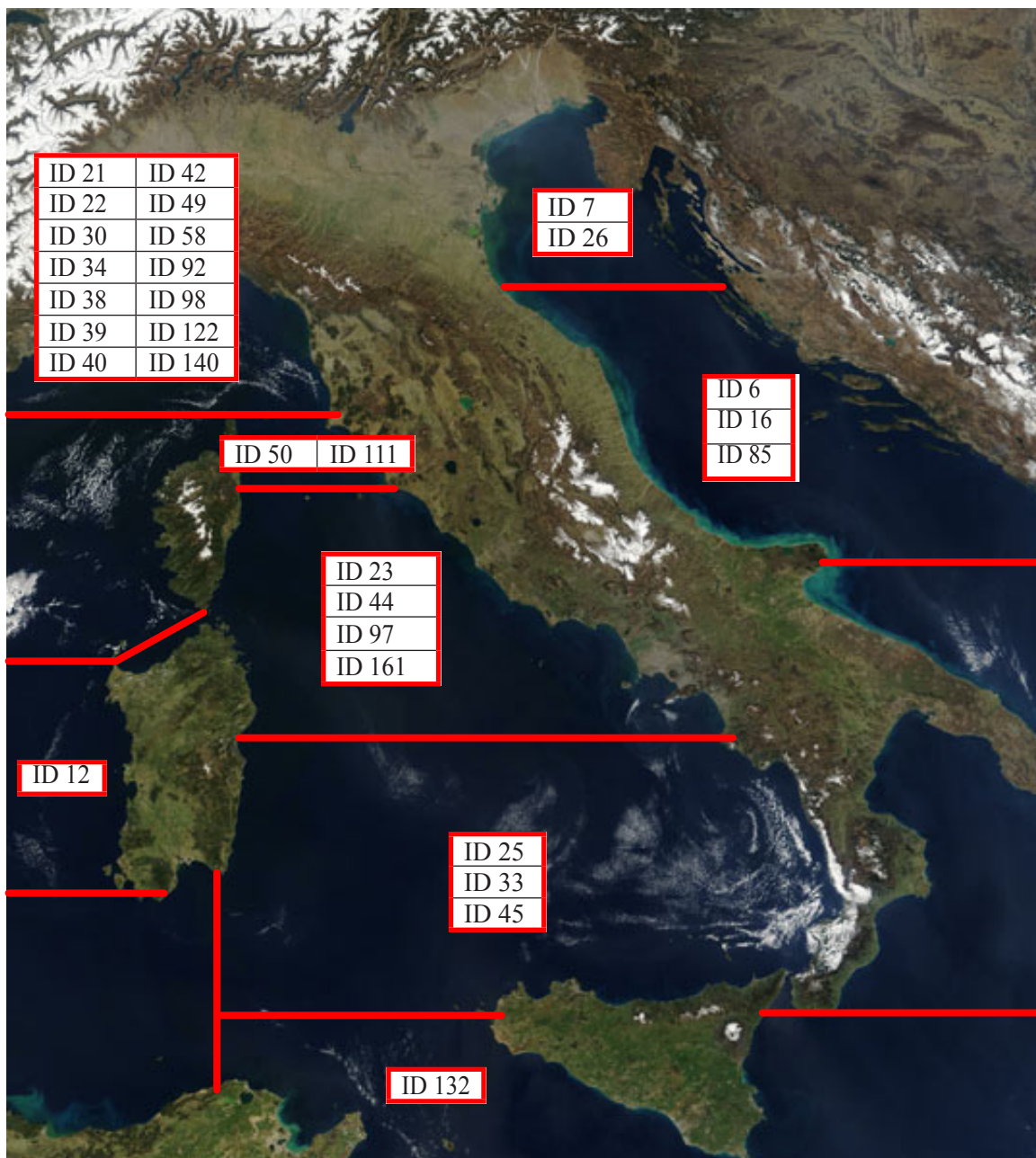


Figura 3.3: distribuzione degli spiaggiamenti di *Stenella coeruleoalba* sulle coste italiane dal 2000 al 2009

3.3 Riduzione dei preparati

I tessuti in formalina, se trascorso il tempo necessario per la fissazione completa del campione, vengono sottoposti al *trimming* (dall'inglese: ordinare, tagliare, ridurre):

- si individua la porzione di tessuto o della lesione che si vuole analizzare e si stabilisce un orientamento preferenziale;
- il campione viene ridotto di dimensioni, con una lama da bisturi modificata, fino a renderne possibile l'inserimento nelle apposite biocassette monouso in resina

acetica per la diagnosi istologica (BIOPTICA s.p.a.);

- inserimento del campione “trimmato” all’interno delle biocassette in modo che la sezione di taglio selezionata poggi sul fondo;
- trascrizione a matita, sulla parte esterna della biocassetta della sigla di registrazione del soggetto e del numero che permette l’individuazione dell’organo; la stessa si riporta, successivamente all’operazione di taglio, sulla parte smerigliata del vetrino.

3.4 Inclusione delle biocassette in paraffina

I campioni all’interno delle biocassette vengono disidratati e inclusi in paraffina. Il processo (18 ore circa) viene effettuato da un processatore automatico per tessuti biologici (Citadel; SHANDON). I passaggi sono i seguenti:

- lavaggio in acqua corrente per 15 minuti;
- immersioni in alcool a concentrazioni scalari (a temperatura ambiente);
- passaggio in alcool al 70% per 90 minuti;
- due passaggi consecutivi in alcool al 90% per 60 minuti ciascuno;
- due passaggi in xilolo, in stufa termostata a 35 °C, per 75 minuti ciascuno;
- tre passaggi consecutivi in bagni di paraffina a 60 °C, i primi due per 60 minuti e il terzo per 30 minuti.

A processazione terminata i campioni vengono liberati dalla biocassetta e inseriti in un contenitore di metallo di forma adeguata, inclusi in paraffina liquida, coperti con la base della biocassetta che riporta l’identificativo di soggetto e organo e infine posti a raffreddare a -10°C (Embed 503; KALTEK s.r.l.). Dopo l’operazione di sgrossamento si possono inserire nel microtomo per il taglio.

3.5 Taglio

Per il taglio abbiamo usato un microtomo rotativo retrattile (AS 325, SHANDON), mediante il quale vengono preparate sezioni di 4 µm; la sezione viene trasportata tramite un pennellino bagnato in acqua fredda, fatta aderire poi ad un vetrino e successivamente immersa in acqua distillata a 45-48 °C ed infine riportata sul vetrino per istologia. I vetrini posizionati ordinatamente in un carrellino vengono mantenuti in stufa a 60 °C per almeno 30 minuti.

3.6 Colorazione di base con ematossilina-eosina (EE) ed esame istopatologico

Prima di procedere alla colorazione, i campioni sono deparaffinati e successivamente idratati. Tutte queste operazioni vengono effettuate dal macchinario automatico (Autostainer, LEICA), programmato per sottoporre le sezioni dei campioni montate su vetrino a immersioni di 3 minuti ciascuna in una scala di alcoli a concentrazione decrescente (100%, 90%, 75%, 50%) ed infine ad un lavaggio in acqua distillata.

Su tutte le sezioni preparate è stata effettuata la colorazione di base con ematossilina eosina, utilizzando un coloratore automatico (Autostainer, LEICA) che esegue i seguenti passaggi:

- immersione in ematossilina per 7 minuti;
- due lavaggi consecutivi in acqua corrente per 5 minuti;
- immersione in eosina in soluzione alcolica per 60 secondi;
- disidratazione nella scala crescente di alcoli (70%, 75%, 90%, 100%);
- passaggio finale in xilolo puro.

Successivamente ad ogni vetrino viene montato il vetrino copri oggetto usando un montante sintetico per preparati istologici, solubile in xilolo (Eukitt, BIOPTICA s.p.a.).

I vetrini così preparati sono quindi pronti per l'osservazione al microscopio ottico.

3.7 Colorazioni istochimiche specifiche

In base alle lesioni istopatologiche riscontrate, si è proceduto ad indagini più approfondite attraverso l'utilizzo di colorazioni speciali secondo i protocolli standard. Prima di effettuare le colorazioni i campioni sono stati deparaffinati e successivamente reidratati.

In particolare sono state utilizzate le seguenti colorazioni istochimiche (vedi protocollo di esecuzione in allegato I): PAS e Grocott-Koski per evidenziare la presenza di funghi o di alghe nelle vie respiratorie, Gram per i batteri, Giemsa per organismi protozoi o ciliati, Tricromica di Masson per evidenziare la fibrosi, Safranina per il grado di maturità delle cartilagini, Blu di Prussia per i pigmenti ematici e ferro e la colorazione dei pigmenti biliari.

3.8 Valutazione macroscopica ed istopatologica ed analisi dei dati

Lo stato di conservazione del soggetto rappresenta uno dei problemi che si pone frequentemente durante lo studio dei mammiferi marini spiaggiati. In Tabella 3.4 sono state riportate le categorie utilizzate per una classificazione macroscopica.

Tabella 3.4: definizione e caratteristiche dei 5 gradi di conservazione dell'animale spiaggiato.

Grado di conservazione	Definizione	Caratteristiche
Categoria 1	Animale vivo	Animale spiaggiatosi vivo, morto in un secondo momento del quale è stata effettuata la necropsia subito dopo la morte.
Categoria 2	Carcassa in buone condizioni	Odore fresco, morfologia normale, minima disidratazione della pelle, degli occhi e delle mucose; lingua e pene non protrudenti; blubber integro, bianco e semi-traslucido; muscoli integri, rosso scuro, ben definiti; visceri intatti e ben definiti; encefalo integro, caratteristiche superficiali distinguibili.
Categoria 3	Decomposto, ma con organi essenzialmente intatti	Carcassa intatta; pene e lingua protrudenti; possibili lesioni post mortem; leggero odore sgradevole; mucose secche; occhi scavati o mancanti; blubber contenente sangue ed oleoso; muscoli e visceri rilasciati e poco definiti; intestino contenente gas; sangue rosso scuro; encefalo molle e fragile.
Categoria 4	Decomposizione avanzata	Carcassa quasi intatta, ma collassata; l'epidermide può essere completamente mancante, severi danni post mortem; forte odore sgradevole; blubber molle, oleoso e spesso con tasche contenenti gas; muscoli molli, strappati e cadenti; sangue scuro; visceri spesso identificabili, ma difficili da sezionare; intestino con molto gas; encefalo color rosso scuro con tasche di gas e di consistenza molle.
Categoria 5	Mummificato o resti Scheletrici	Pelle stesa sui resti scheletrici, resti di tessuto Seccati.

Le sezioni di tessuto polmonare sono state a loro volta suddivise in base al grado di conservazione del parenchima come si osserva nella Tabella 3.5.

Tabella 3.5: caratteristiche dei 5 gradi di conservazione delle sezioni di tessuto polmonare

Categoria	Caratteristiche
1	Preparato caratterizzato dall'assenza o minimi reperti autolitici, con particolari cellulari ben definiti e distinti (citoplasma, nucleo, distinzione tra i vari tessuti, ciglia), in particolare per le cellule labili (epitelio, endotelio, etc.).
2	Preparato caratterizzato da lievi reperti autolitici, in particolare a carico dei tessuti labili.
3	Preparato caratterizzato da moderati reperti autolitici con evidenti alterazioni ai tessuti labili e minime modificazioni post-mortem dello stroma connettivale. Potenziale proliferazione post-mortem di batteri anaerobi nei vasi con possibile formazione di bolle da fermentazione.
4	Preparato caratterizzato da gravi reperti autolitici con difficoltà a riconoscere le strutture che compongono il parenchima. Moderate modificazioni post-mortem dello stroma connettivale. Talvolta può essere necessario l'uso di colorazioni istochimiche specifiche per riconoscere i tessuti. Presenza di colorazioni anomale. Proliferazione post-mortem di batteri anaerobi nei vasi con bolle da fermentazione.
5	Preparato caratterizzato da diffuse e gravi lesioni post-mortem con perdita della struttura e con la possibilità di riconoscere esclusivamente il tessuto connettivale di sostegno.

Tutte le sezioni sono state sottoposte a colorazione con ematossilina-eosina (EE) e sono state esaminate al microscopio ottico (Leica DMD108 e Nikon Eclipse E100). È stata effettuata una valutazione preliminare ricercando alterazioni riferibili ad atelettasia, enfisema, iperemia, fibrosi, antracosi, presenza di infiltrato infiammatorio, mineralizzazioni e, se visibile, presenza di agenti infettanti (parassiti, miceti, batteri, virus) o lesioni ad essi riferibili o presenza di materiale esogeno. In linea generale, le sezioni di tessuto che presentavano un grado di conservazione compreso tra 1 e 3 sono state sottoposte a indagini approfondite tramite colorazioni particolari; mentre, le sezioni che presentavano un grado di conservazione 4 e 5 sono state valutate solo per alcuni parametri come edema, iperemia, fibrosi, presenza di granulomi e mineralizzazioni. Al termine dell'esame microscopico sono state effettuate delle indagini descrittive.

3.9 Quantificazione del grado delle alterazioni istologiche prese in esame

Le anomalie del contenuto d'aria, l'atelettasia e l'enfisema, sono state valutate attraverso parametri qualitativi indicando se assenti o presenti e, in quest'ultimo caso, sono state

suddivise in lievi, moderate o gravi; secondariamente è stato loro attribuito un valore numerico compreso tra 0 (assente) a 3 (grave). Lo stesso metodo è stato utilizzato per la valutazione dell'edema e dell'iperemia (Tab. 3.6).

Tabella 3.6: quantificazione anomalie circolatorie e del contenuto d'aria polmonari

Enfisema Atelettasia Edema Iperemia	Assente	0
	Lieve	1
	Moderato	2
	Grave	3

La fibrosi è stata quantificata come si osserva in Tabella 3.7 in assente, lieve, moderata, grave ed infine grave con alterazioni morfologiche (rapporto tra strutture bronchiali, vascolari, spazi respiratori). Assegnando a questi gradi un valore che va da 0 a 4.

Tabella 3.7: quantificazione della fibrosi polmonare

Fibrosi	Caratteristiche	Grado
Assente	Assente	0
Lieve	Occasionali focolai di deposizione di tessuto fibroso o minimo ispessimento settale	1
Moderata	Alcuni focolai di deposizione di tessuto fibroso o moderato ispessimento settale	2
Grave	Frequenti focolai di deposizione di tessuto fibroso o grave ispessimento settale	3
Grave con alterazioni anatomiche	Frequenti focolai di deposizione di tessuto fibroso o grave ispessimento settale associato ad alterazione della morfologia tissutale	4

Per quanto riguarda la quantificazione dell'antracosi, abbiamo proceduto con l'osservazione di 10 campi scelti casualmente ad un ingrandimento 40x della sezione di tessuto polmonare. La presenza di antracosi per ogni campo è stata indicata con 1, mentre l'assenza con 0. Attraverso la sommatoria totale delle singole osservazioni si è stabilito il grado di antracosi (Tab. 3.8).

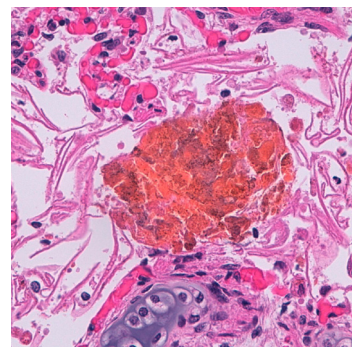
Tabella 3.8: quantificazione dell'antracosi

Antracosi	0	Assente
	1-2	Minima
	3-5	Lieve
	6-8	Moderata
	9-10	Grave

Nel caso particolare della MAS abbiamo ritenuto opportuno procedere con un'analisi descrittiva e quantitativa dei reperti. Le sezioni di tessuto dei cuccioli e dei feti di *T. truncatus* (ID 18, 36, 94, 96, 102, 114, 123) e *S. coeruleoalba* (ID 21, 22, 50), presenti nella BIT sono stati innanzitutto sottoposti a colorazione ematossilina-eosina e successivamente, di routine, a colorazioni particolari quali: Gram, PAS, Giemsa e Tricromica di Masson, per valutare la presenza di eventuali agenti infettivi o alterazioni strutturali del parenchima. Sulle sezioni di parenchima polmonare è stata inoltre effettuata l'immunoistochimica per valutare la presenza di cellule epiteliali o squame cheratiniche utilizzando un anticorpo anti-panCK utilizzando la metodica data sheet. La presenza di cellule epiteliali, squame cheratiniche o meconio è stata quantificata in percentuale tramite l'osservazione di 50 campi, per ogni sezione di preparato, scelti casualmente e osservati a 40x.

4. RISULTATI

I dati vengono di seguito analizzati mantenendo distinti i tursiopi (*T. truncatus*) mantenuti in ambiente controllato (TC), a vita libera (TL) e le stenelle (*S. coeruleoalba*). I grafici sotto riportati (4.1 e 4.2) mostrano il numero e la distribuzione geografica degli animali a vita libera ottenuti dalla BIT (Banca per i Tessuti dei Mammiferi Marini del Mediterraneo): si vede come i tursiopi siano prevalentemente derivanti dal Mare Adriatico (11 da quello settentrionale e 2 da quello centrale).



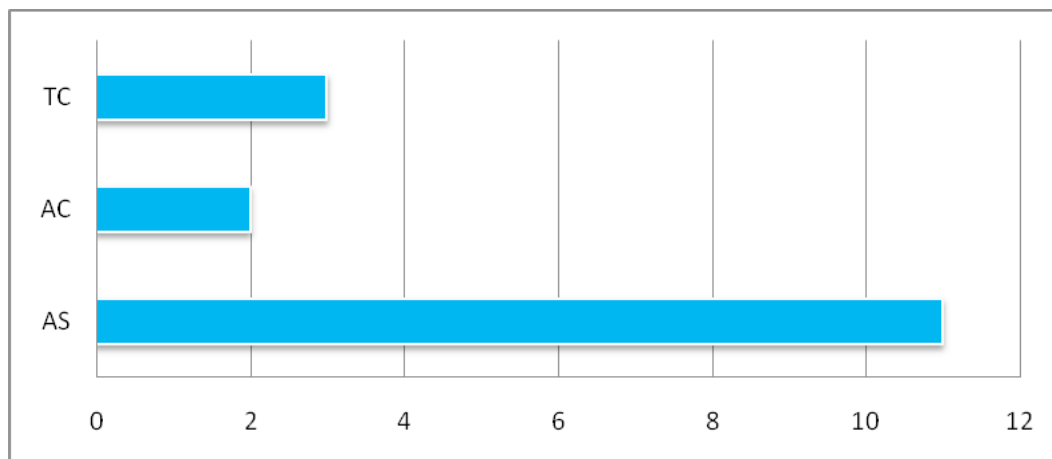


Grafico 4.1: quantificazione della distribuzione dei *T. truncatus* in relazione alle aree marine

Le stenelle, invece, derivano in gran parte dal bacino del Mar Ligure (14 spiaggiamenti), dove risultano peraltro la popolazione di cetacei più abbondante (Notarbartolo di Sciarra e Demma, 2004). Le coste tirreniche, assieme al Mare di Sardegna e al Canale di Sicilia, sono state interessate da un totale di 10 spiaggiamenti; infine l'Adriatico è il settore marino che risulta essere meno interessato dagli spiaggiamenti di questa specie, come ci aspettavamo dalle premesse sulla distribuzione delle stenelle nel Mediterraneo.

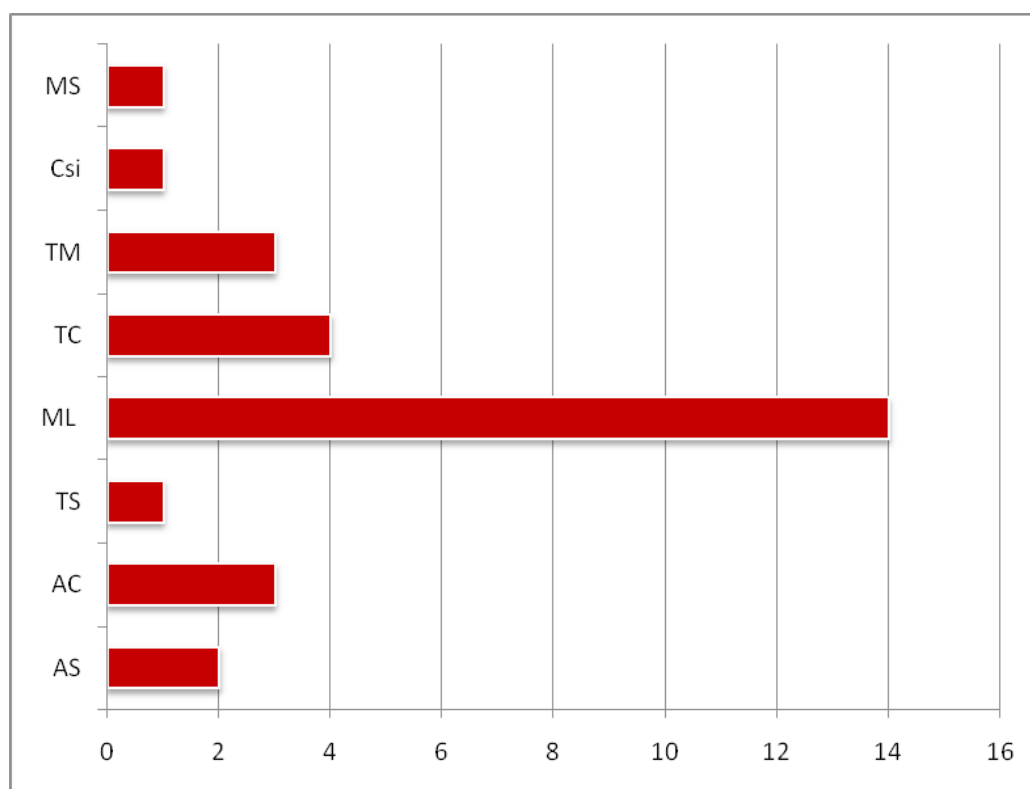


Grafico 4.2: quantificazione della distribuzione dei *S. coeruleoalba* in relazione alle aree marine

Per un ulteriore chiarimento, gli spiaggiamenti delle due specie di cetacei prese in considerazione nel nostro studio vengono rapportati, dal punto di vista grafico, in figura 4.1.

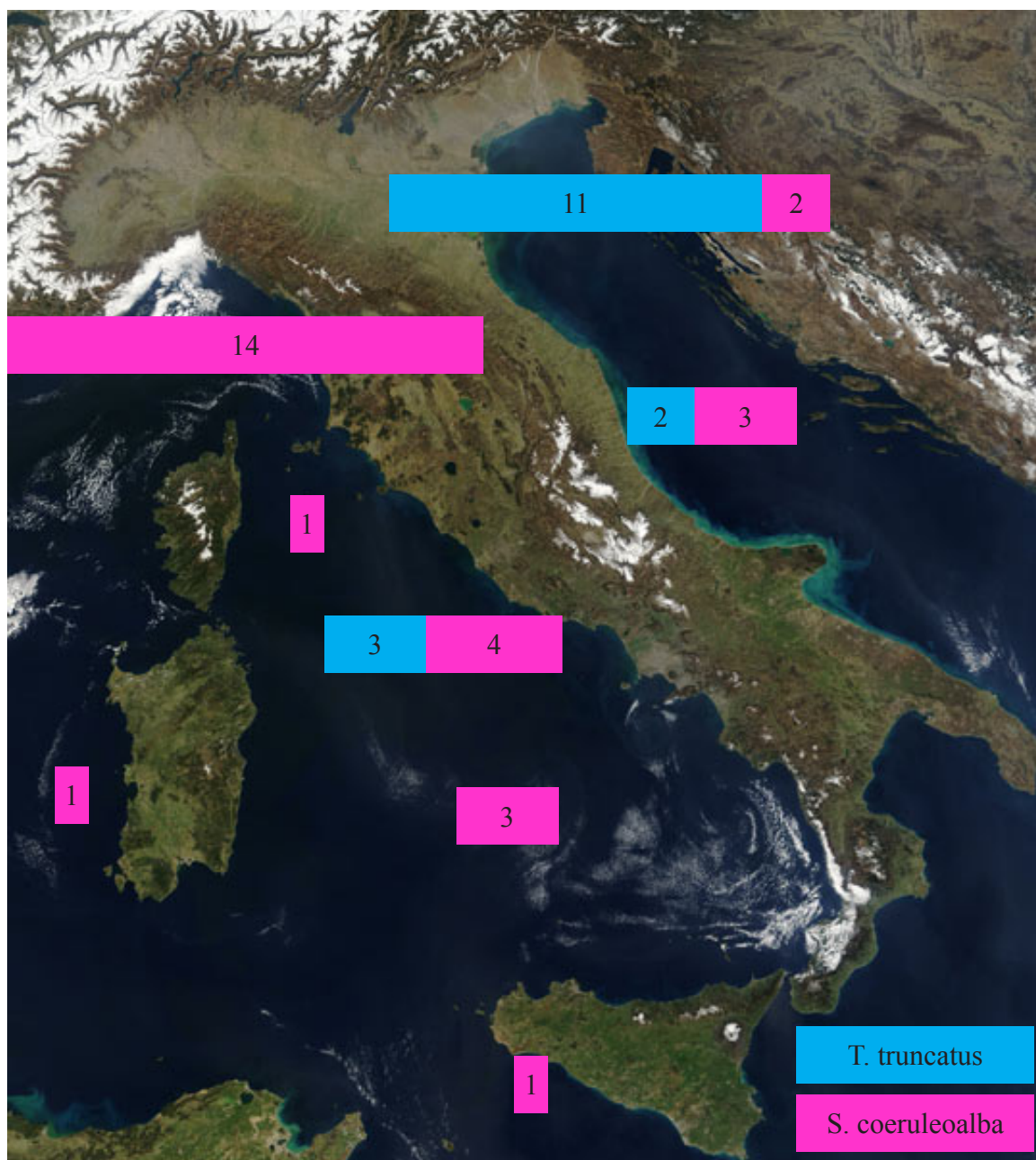


Figura 4.1: distribuzione geografica degli individui spiaggiati di *T. truncatus* e *S. coeruleoalba* lungo le coste italiane

4.1 Grado di conservazione delle sezioni di tessuto polmonare

Il grado di conservazione delle sezioni di tessuto polmonare è il fattore determinante per ottenere una dettagliata e precisa descrizione delle alterazioni istologiche. Come si evince dai grafici seguenti (4.3a, 4.3b e 4.3c), gli individui in cattività sono effettivamente meglio

conservati rispetto ai tursiopi a vita libera e alle stenelle; i preparati per l'istologia con un grado di conservazione compreso tra 1 e 3 sono rispettivamente il 100% per i primi, il 56% per i tursiopi a vita libera e il 55% per le stenelle.

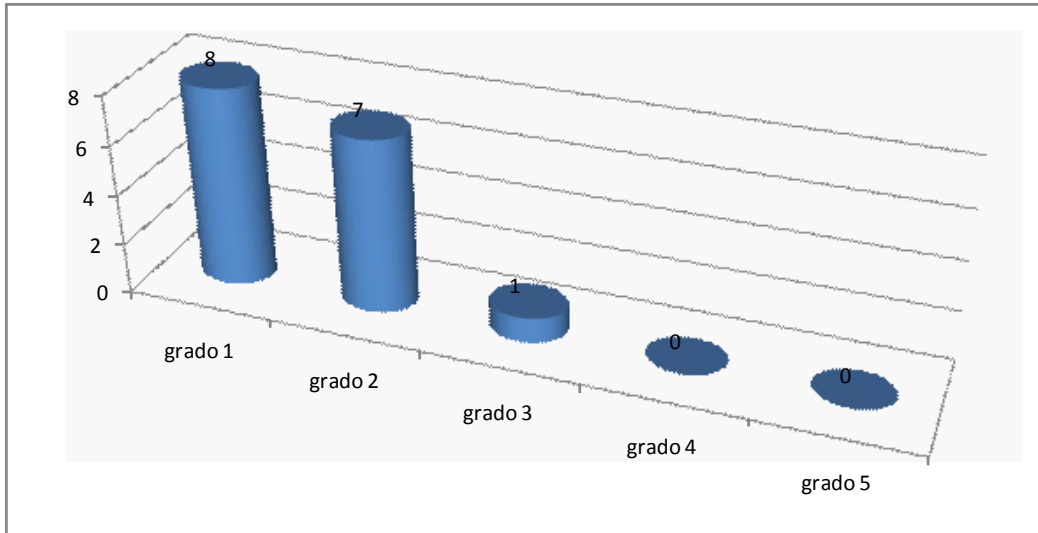


Grafico 4.3a: grado di conservazione delle sezioni di tessuto polmonare di *Tursiops truncatus* mantenuti in ambiente controllato

Come si osserva dalla tabella 4.3, le sezioni di tessuto polmonare dei 16 tursiopi mantenuti in ambiente controllato presentano, per la stragrande maggioranza dei casi, grado di conservazione 1 (ID 114, 123, 133, 139, 144, 145, 146, 159) e 2 (9, 18, 20, 89, 102, 107, 124); solo la sezione di 1 soggetto presenta un grado pari a 3 (ID 4).

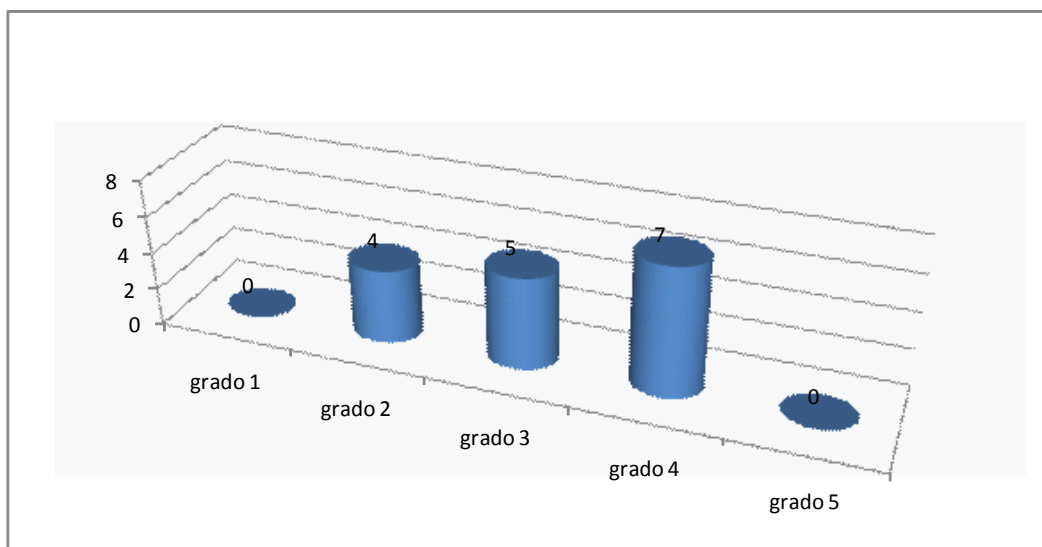


Grafico 4.3b: grado di conservazione delle sezioni di tessuto polmonare di *Tursiops truncatus* a vita libera

Su un totale di 16 soggetti di *Tursiops truncatus* a vita libera 4 presentavano un grado di conservazione pari a 2 (ID 88, 96, 110, 142), 5 soggetti un grado 3 (ID 94, 95, 100, 162, 165) e, infine, 7 un grado pari a 4 (ID 2, 36, 55, 127, 147, 163, 164).

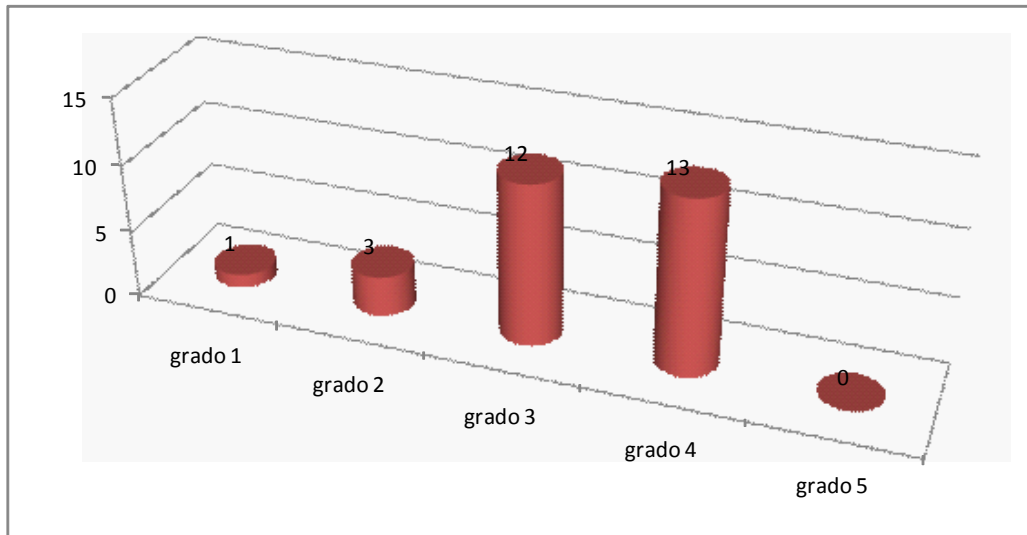


Grafico 4.3c: grado di conservazione delle sezioni di tessuto polmonare di *Stenella coeruleoalba*

Su un totale di 29 soggetti di *Stenella coeruleoalba* a vita libera, 1 presenta un grado di conservazione pari a 1 (ID 161), i preparati istologici di 3 soggetti sono caratterizzati da un grado di conservazione pari a 2 (ID 12, 25, 42), alle sezioni di 12 soggetti abbiamo attribuito un grado 3 (ID 6, 16, 26, 30, 33, 34, 40, 49, 85, 122, 132, 140) e, infine, a 13 soggetti un grado di conservazione 4 (ID 7, 21, 22, 23, 38, 39, 44, 45, 50, 58, 92, 97, 98).

4.2 Peculiarità anatomiche

Durante le indagini e la valutazione dei dati in archivio si è notato come gli ID 34, 142, 161, 165, esemplari su cui è stato possibile eseguire la necropsia, macroscopicamente presentavano un'evidente alterazione bilaterale diffusa a carico delle porzioni medie e apicali ventrali che vanno a interporsi tra il cuore e la parete toracica in situ, caratterizzata da perdita progressiva della componente alveolare e interstiziale con disegno bronchiolare evidenziabile nell'ambito di un tessuto gravemente assottigliato, trasparente, di colore giallastro, riferibile a probabile sierosa. Superficialmente a tale tessuto sono presenti aree multifocali di colorito biancastro e consistenza compatta riconducibili a possibile ispessimento della sierosa stessa.

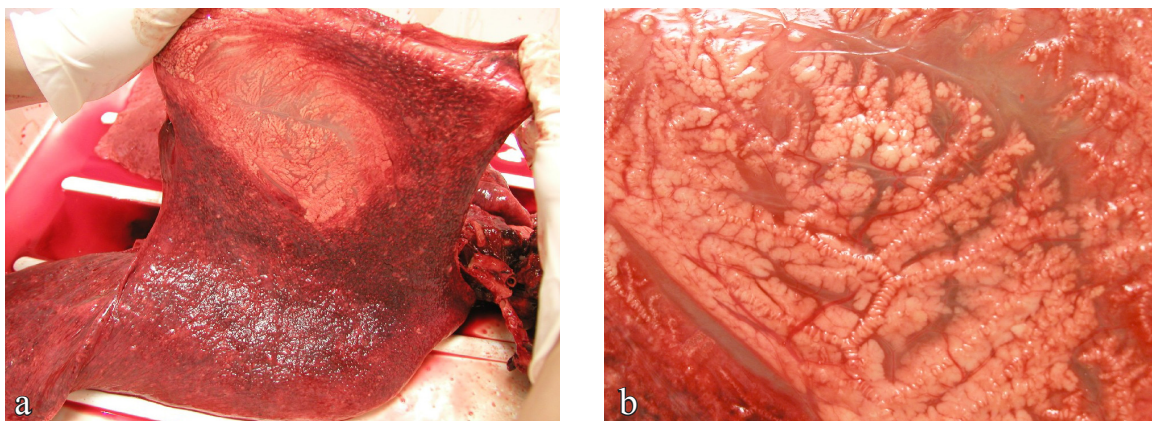


Figura 4.2a e 4.2b: polmoni con ipoplasia alveolare congenita bilaterale (a) e particolare con trama bronchiale e bronchiolare (ID 34) (b)

Istologicamente l'assottigliamento si presenta con componente alveolare prima atelettasica e poi ipoplastica man mano che ci si sposta con il microscopio in direzione dei margini. La componente bronchiale e bronchiolare si mantiene costante in tutti i preparati ed è possibile osservare numerose formazioni circolari determinate da strati concentrici, con aspetto fortemente basofilo, riferibili a calcificazioni mineralizzate (Fig. 4.3).

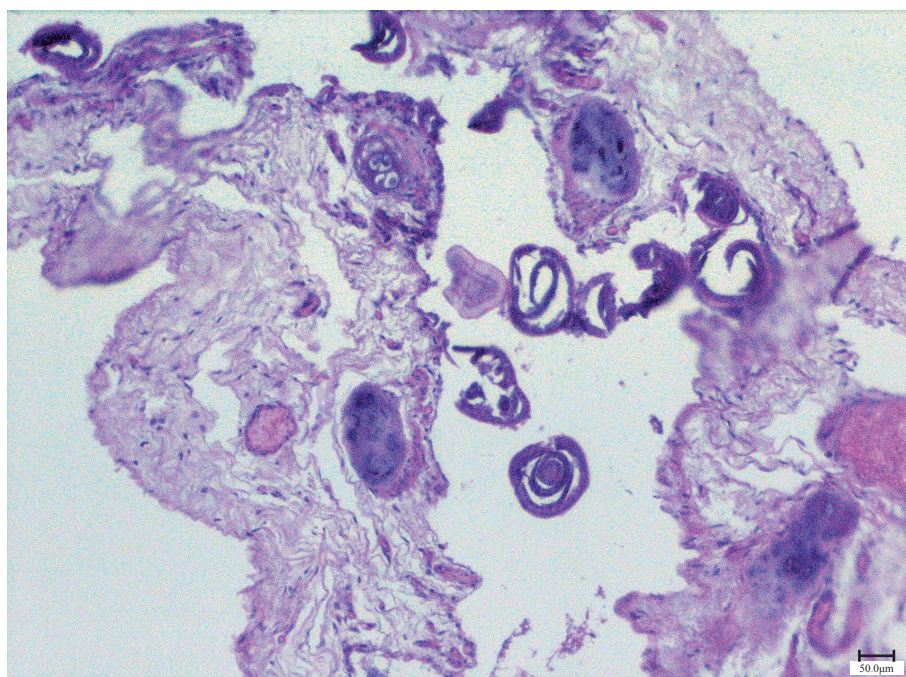


Figura 4.3: sezione istologica dell'ipoplasia alveolare con mineralizzazioni lamellari concentriche (ID 34; EE 10x)

Nella valutazione microscopica a carico dei tessuti polmonari dell'ID 159 è stata individuata la presenza di ghiandole mucipare nellamucosa dei bronchi di maggiori dimensioni, tra l'epitelio e le cartilagini (Fig. 4.4).

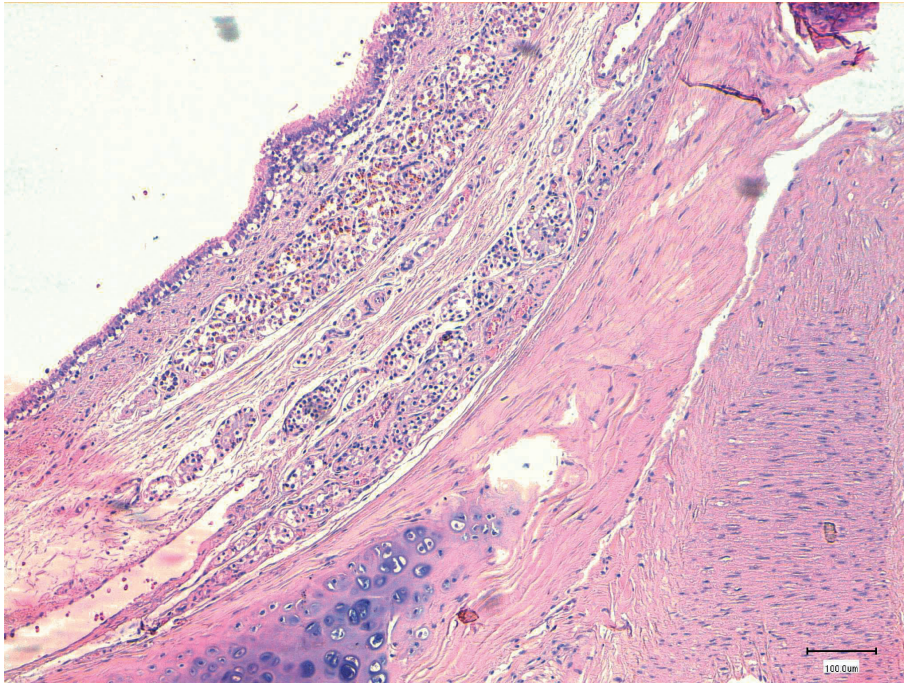


Figura 4.4: ghiandole mucipare nella mucosa bronchiale (ID 159; EE 10x).

4.3 Aspetti macroscopici delle alterazioni polmonari

Gli aspetti morfologici delle alterazioni polmonari sono stati valutati considerando sia il materiale fotografico di archivio, sia gli organi direttamente valutati durante l'esame post-mortem, Abbiamo riscontrato una limitata variabilità di lesioni, anche quando sono stati isolati agenti patogeni poi ritenuti causa del decesso o dello spiaggiamento. Durante l'esame necroscopico abbiamo osservato evidenti quadri patologici riferibili a disordini cardiocircolatori come edema e iperemia (Fig. 4.5 e 4.6).

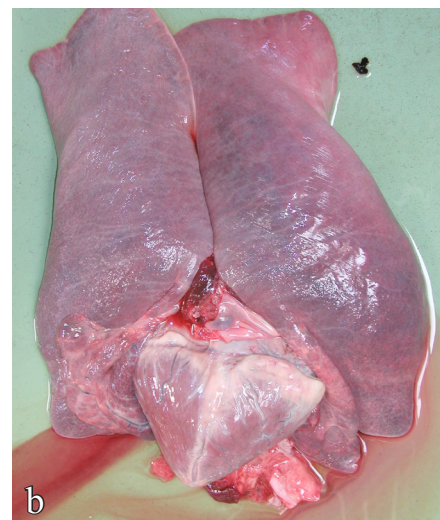
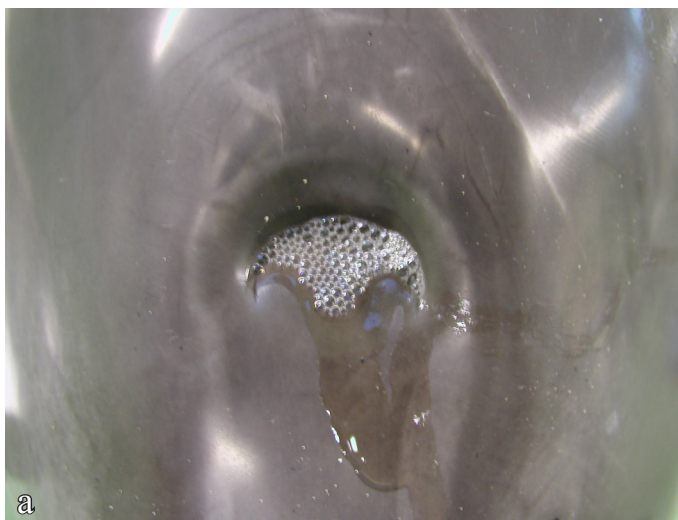


Figura 4.5a e 4.5b: edema polmonare dallo sfiatatoio e quadro di edema polmonare

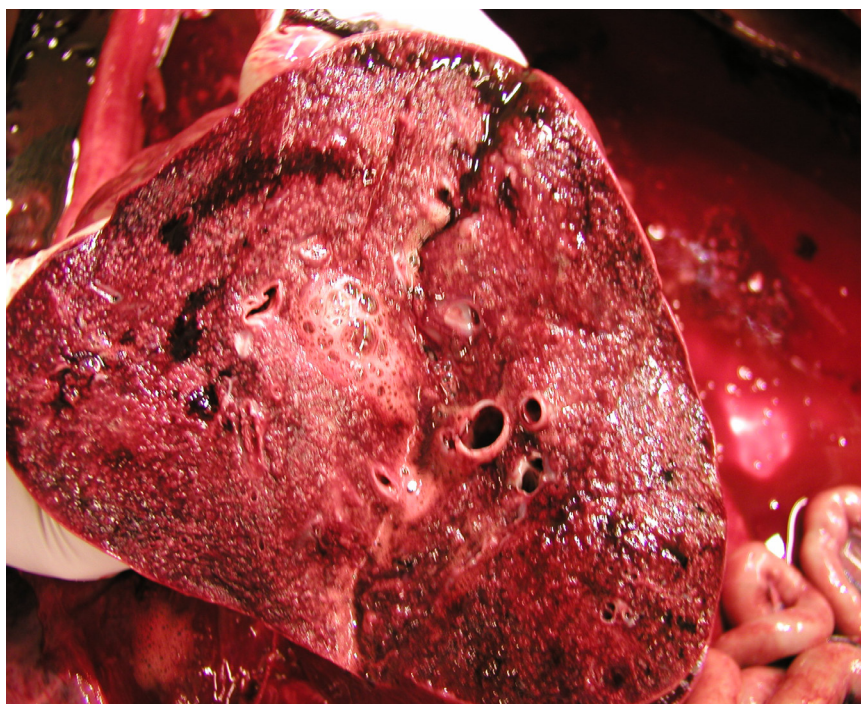


Figura 4.6: iperemia del parenchima polmonare

Abbiamo osservato, inoltre, reperti infiammatori cronici (Fig. 4.7) o esiti cicatriziali (Fig. 4.8), soprattutto parassitari.

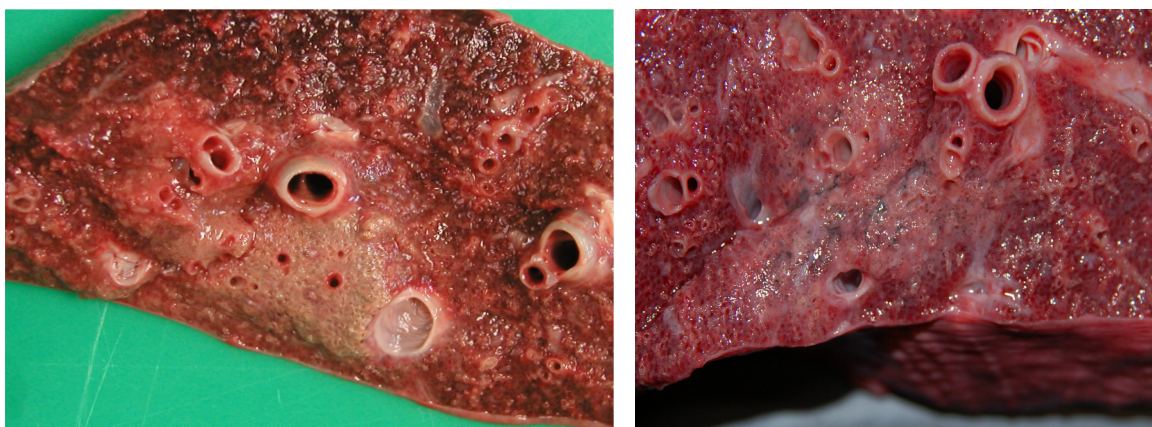


Figura 4.7 e 4.8: quadro di broncopolmonite micotica (ID 142, a destra) e quadro di fibrosi associato ad aree nerastre riferibili a deposizione di particolato antracotico (a sinistra).

Raramente, invece, abbiamo osservato quadri riferibili a processi essudativi o emorragici (Fig. 4.9).



Figura 4.9: sezione di taglio polmonare con edema e emorragie.

4.4 Valutazione istopatologica dei preparati

I soggetti con grado di conservazione 1, 2, e 3 sono stati valutati per tutti i parametri descritti nel paragrafo 3.7 (enfisema, atelettasia, edema, iperemia, fibrosi, antracosi, infiltrato infiammatorio, mineralizzazioni, presenza di parassiti), mentre i soggetti con grado di conservazione 4 e 5 sono stati valutati solo per alcuni dei suddetti parametri (edema, iperemia, mineralizzazioni e presenza di granulomi parassitari).

I risultati riguardanti enfisema, atelettasia (alterazioni del contenuto d'aria), edema e iperemia, vasocostrizione, vasculiti (alterazioni del circolo) sono stati descritti solamente nei soggetti con grado di conservazione compreso tra 1 e 3; l'edema e l'iperemia sono stati osservati anche negli altri (grado di conservazione 4 e 5).

4.4.1 Alterazioni del contenuto d'aria e del circolo.

Su un totale di 41 soggetti esaminati con grado di conservazione compreso tra 1 e 3 è stato osservato che l'enfisema è osservabile nel 24% degli animali e l'atelettasia nel 29%. I tursiopi a vita libera e mantenuti in ambiente controllato presentano enfisema di grado da lieve a moderato; nelle stenelle, invece, il grado varia tra moderato e grave. In 4

soggetti di tursiope di nove giorni mantenuti in ambiente controllato abbiamo descritto la presenza di atelettasia fetale (ID 114, 123, 124, 144). Nel gruppo dei soggetti di stenella che presentano atelettasia, il 33% è di grado grave mentre per i tursiopi il grado di atelettasia è prevalentemente moderato. Nel 62% dei soggetti totali esaminati (61), compresi quelli con grado di conservazione 4 e 5, si riscontra la presenza più o meno grave di edema: 13 presentano grado 3, 14 un grado pari a 2 e infine 11 soggetti grado 1. L'iperemia si osserva in 40 casi su 61 (66%) e nel 74% dei casi si manifesta in forma grave. Su un totale di 38 soggetti presentanti edema in 8 (21%) risulta associato a attivazione della componente macrofagica. L'edema, inoltre, risulta associato ad iperemia nel 74% dei casi (28) e ad iperemia con emorragie in 15 (54%) dei 28 totali. Ipertrofia dell'endotelio è stata osservata negli ID 12, 39, 114, 123 e 144. Nell'ID 142 è stato individuato un quadro di vasculite compatibile con l'infezione micotica (Fig. 4.10).

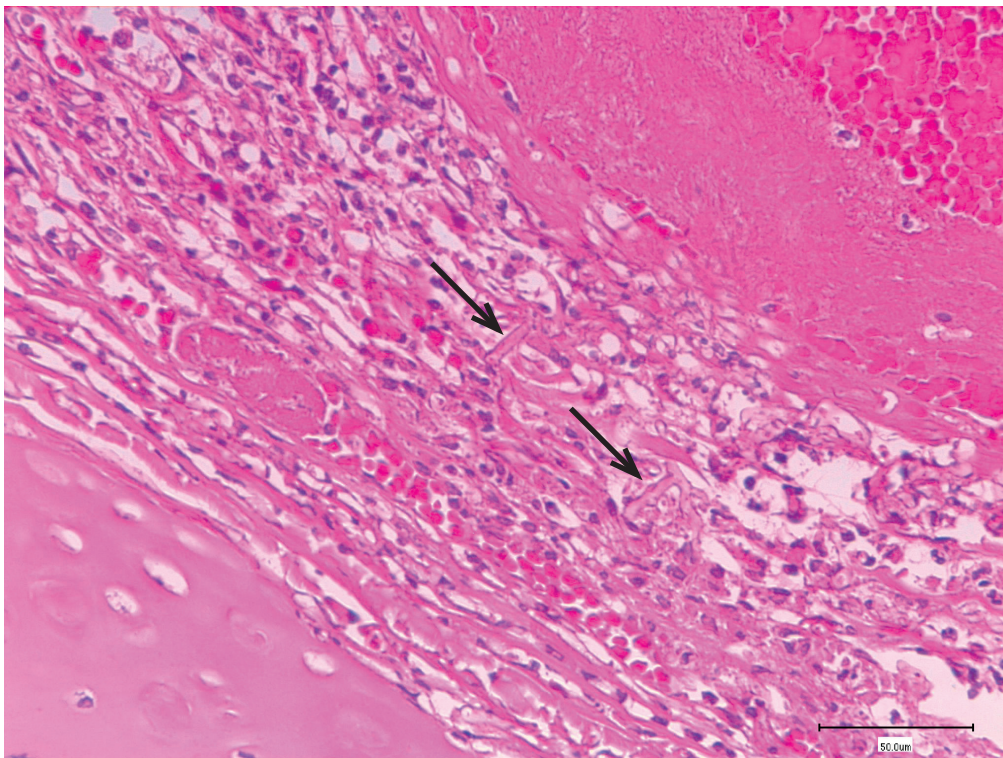


Figura 4.10: vasculite con presenza di ife fungine (ID 142; EE 40x).

Negli ID 49 e 142 si osserva la presenza di coaguli e trombi in un caso associati ad eziologia micotica (ID 142) (Fig. 4.11).

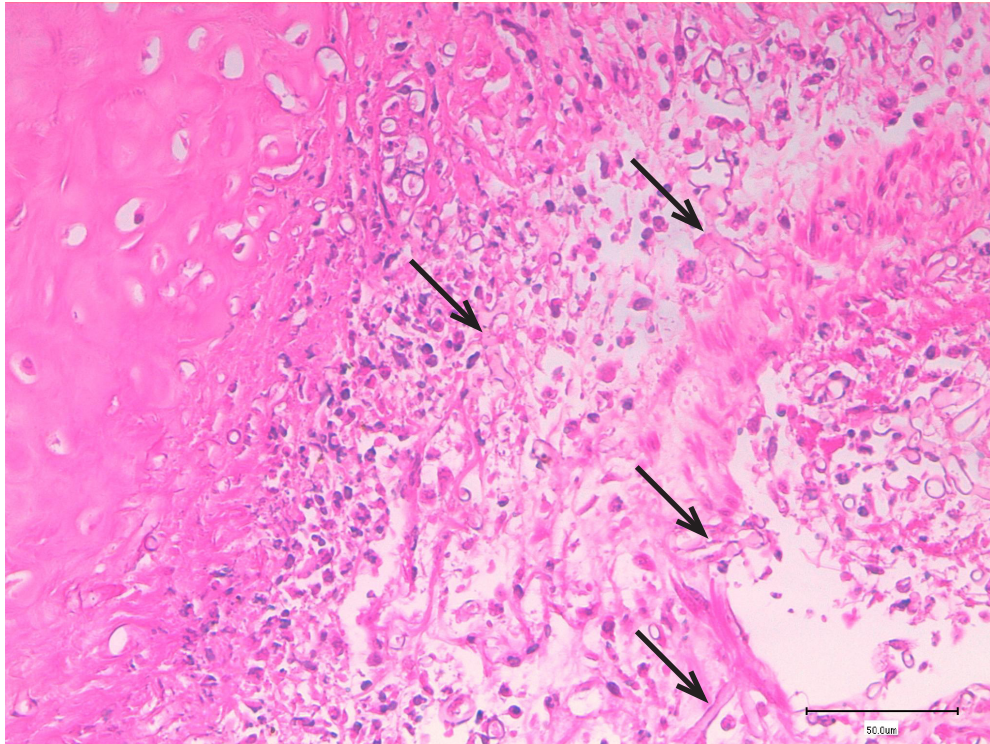


Figura 4.11: trombo intravasale con ife fungine in prossimità di una struttura bronchiale (ID 142; EE 40x). Nell'ID88, il grado di fibrosi rinvenuta nelle sezioni, tale da determinare un sovvertimento della struttura anatomica, si nota inoltre abbondante neovascolarizzazione si reperta associata a broncopolmonite granulomatosa parassitaria multifocale moderata associata a un grado di fibrosi con alterazione della struttura anatomica del parenchima polmonare (ID 88).

4.5 Descrizione dei dati e dei parametri associati alla risposta infiammatoria.

Per la creazione delle successive tabelle 4.1a, 4.1b e 4.1c abbiamo mantenuto la suddivisione delle 2 specie (tursiopi e stenelle) in 3 gruppi di studio (tursiopi mantenuti in ambiente controllato, a vita libera e stenelle). In particolare, per quanto riguarda la flogosi, si è cercato di distinguere le varie popolazioni cellulari per meglio caratterizzare l'entità della risposta infiammatoria. Per una miglior resa grafica delle tabelle siamo ricorsi all'utilizzo di abbreviazioni che riportiamo qui di seguito: R. inf.: risposta infiammatoria; M: macrofagi; cgm: cellule giganti polimorfo nucleate; L: linfociti; p: plasmacellule; N: neutrofili; E: eosinofili; Ff: fibrosi; Par: parassiti; Batt: batteri; Fu: funghi; PI: polmonite interstiziale; BP: broncopolmonite; P: polmonite; G: gram; P: polmonite; BP: broncopolmonite; PI polmonite interstiziale. I reperti infiammatori

sono infine stati associati gli eventuali agenti eziologici ritrovati durante gli esami post-mortem.

Tabella 4.1a: analisi dei parametri dei soggetti di *T. truncatus* mantenuti in ambiente controllato con grado di conservazione 1, 2, 3.

ID	R. inf.	Popolazione infiammatoria				Ff	Fu
		M (M+cgm)	L (L+p)	N	E		
4	PI cronica multifocale lieve	++	+			0	
18	PI cronica multifocale lieve	++	+			0	
20	Bronchite cronica grave con bronchiectasia e PI cronica multifocale lieve	+++	++ p			2	
107	BP granulomatosa multifocale grave	+++	++	++	+	0	x
114	PI cronica attiva con presenza di meconio	++	+	+		0	
133	PI cronica multifocale lieve	++	+ p			4	
139	Fibrosi polmonare					2	
144	PI peribronchiale multifocale lieve	++		+		0	
145	PI p interstiziale da moderata a grave	+++				0	
146	PI peribronchiale cronica multifocale lieve	++		+		0	
159	PI cronica peribronchiiale moderata	++	++			4	

Nella tabella 4.1a, sono stati riportati gli 11 animali, su un totale di 16 mantenuti in ambiente controllato, che presentano un quadro infiammatorio del parenchima polmonare, escludendo quindi, l'ID 89 che presentava solo marginazione neutrofilica e una scarsa popolazione di macrofagi attivi associati ad un'imponente presenza di edema nel lume alveolare e i soggetti ID 9, 102, 123 e 124. Nove soggetti presentano un quadro di polmonite interstiziale a componente prevalentemente macrofagica, associata a linfociti nel 66% dei soggetti. Solo nell'ID 107 è stata diagnosticata una broncopolmonite granulomatosa,

multifocale, grave, caratterizzata da popolazione infiammatoria mista (macrofagi, linfociti, neutrofili e eosinofili) ed associata alla presenza di ife fungine. In tabella è stata eliminata la colonna relativa ai batteri in quanto, in nessuno dei casi esaminati, ne è stato isolato uno.

Tabella 4.1b: analisi dei parametri dei soggetti di *T. truncatus* a vita libera con grado di conservazione 1, 2, 3.

ID	R. inf.	Popolazione infiammatoria				Ff	Par	Batt	Fu
		M (M+cgm)	L (L+p)	N	E				
88	BP granulomatosa parassitaria multifocale moderata	+++	++	++	++	4	X	G+	
94	B cronica moderata con occasionale sovvertimento della struttura bronchiale	+++ cgm	+++	+		0			
95	P granulomatosa parassitaria multifocale lieve.	++		+	+	0	X		
96	PI subacuta da moderata a grave	+++		++		0			
100	BP cronica lieve	+++	+p	+		0	X		
110	PI cronica multifocale lieve	+++	++	+		2	X	G-	
142	BP piogranulomatosa grave associata a vasculite	+++		++	+	0	X		X
162	BP cronica multifocale moderata	+++				0		G-	
165	BP sub-acuto grave multifocale	+++		++		3	X	G-	

Di 9 soggetti di tursiopi a vita libera con grado di conservazione compreso tra 1 e 3, il 100% presenta un quadro infiammatorio a livello polmonare. In 5 soggetti su 9 abbiamo individuato una broncopolmonite caratterizzata da popolazione infiammatoria prevalentemente macrofagica, in 4 soggetti su 5 associata alla presenza di parassiti (Figura 4.6). Nei casi in cui si reperta la presenza di eosinofili nella popolazione infiammatoria questa è sempre associata alla presenza di parassiti.

L'ID 88 presenta un quadro di broncopolmonite granulomatosa parassitaria multifocale moderata associata a necrosi e moderata iperplasia dell'epitelio respiratorio con ampi

tratti di metaplasia squamosa (Fig. 4.12). La popolazione dei macrofagi interstiziali è caratterizzata dalla presenza di alcuni elementi con citoplasma aumentato contenente pigmento PAS+ (Fig. 4.13).

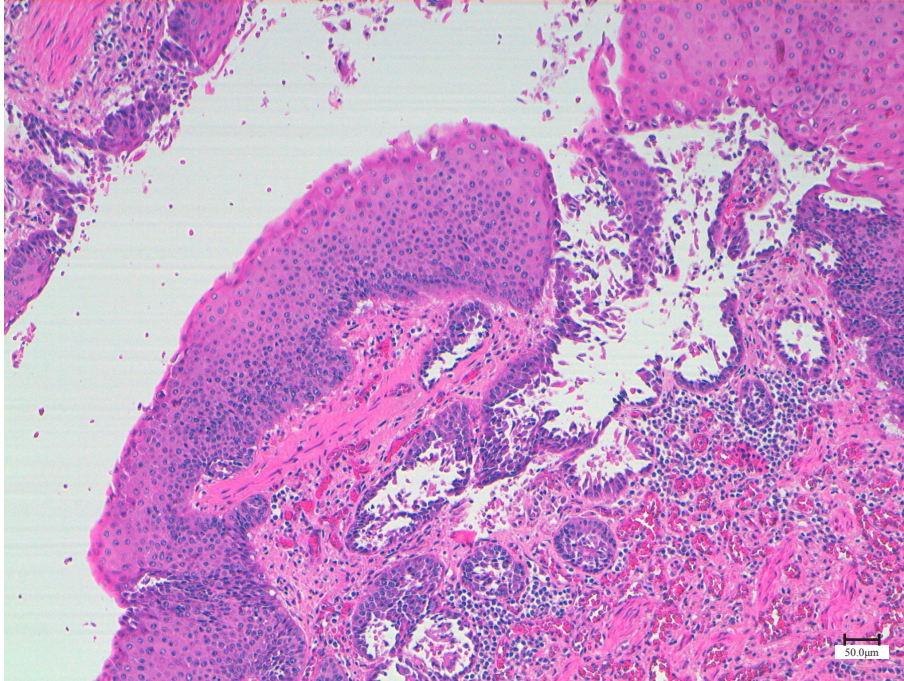


Figura 4.12: iperplasia, metaplasia squamosa dell'epitelio bronchiale e bronchite cronica (ID 88; EE 10x).

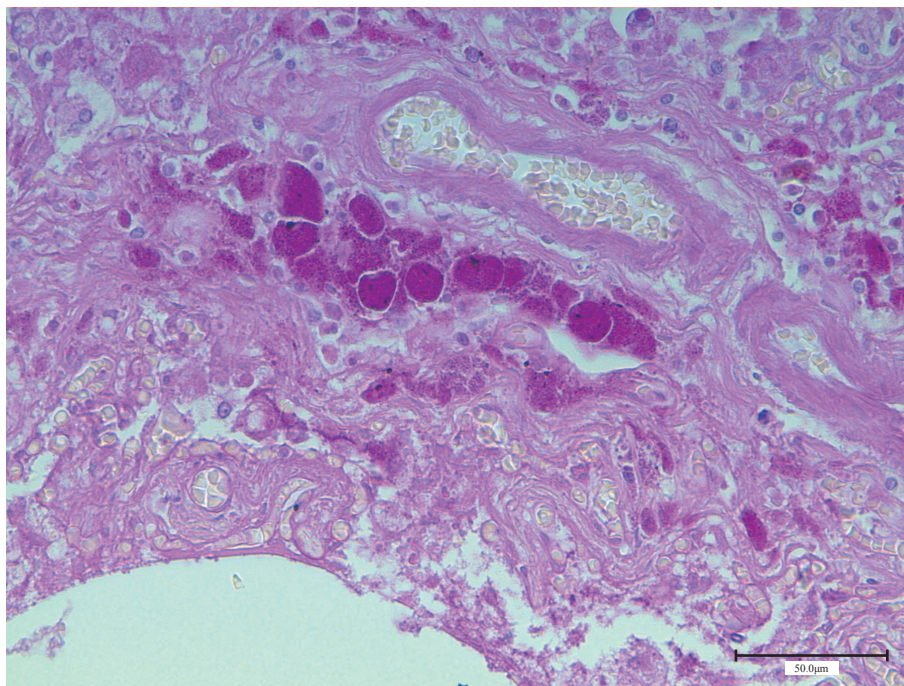


Figura 4.13: macrofagi interstiziali con contenuto citoplasmatico PAS+ (ID 88; PAS 40x)

Particolarmente interessante il caso dell'ID 142 in cui si reperta una broncopolmonite

piogranulomatosa grave associata a vasculite (Fig. 4.9) e trombi micotici (Fig. 4.10). In questo caso, nelle sezioni alla colorazione specifica PAS si osservano la presenza di ife e pseudoife fungine, occasionalmente settate, aventi dimensioni di 3-8 μm di diametro, con occasionali lieviti sferici e gemmazioni che, sulla base delle caratteristiche morfologiche, sono compatibili con un'infezione da *Candida* sp. . Questo è l'unico caso in cui il gravissimo quadro polmonare rappresenta verosimilmente la causa di decesso dell'animale. Nella figura 4.14 si osserva il particolare del lume bronchiale contenente ife associate a broncocostrizione.

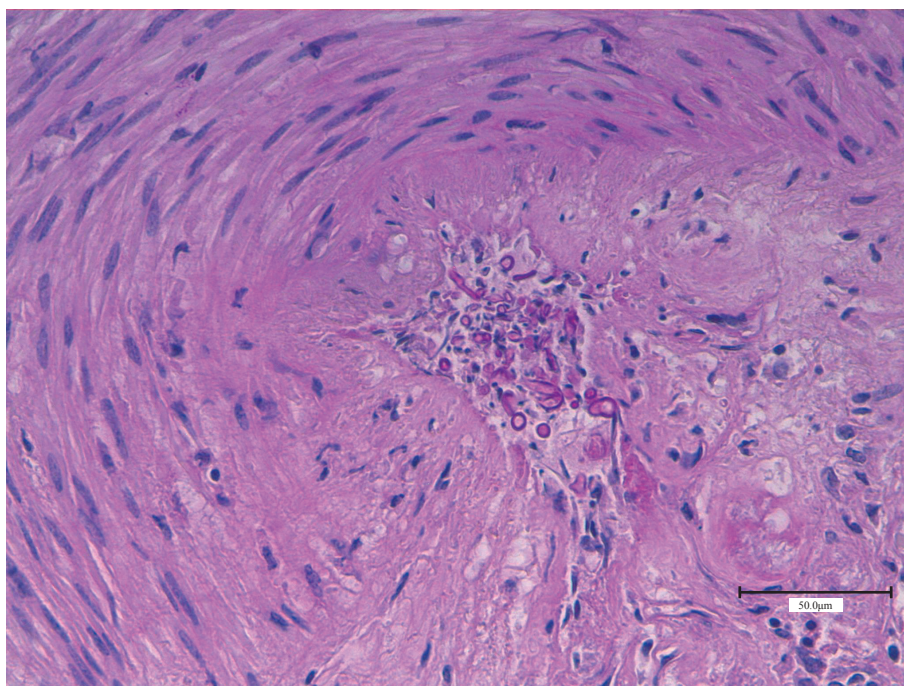


Figura 4.14: broncocostrizione con presenza nel lume di ife fungine (ID 142; PAS 40x).

Su un totale di 10 soggetti 3 presentavano un quadro di polmonite interstiziale e in uno su 3 (ID 110) è stata associata infestazione batterica e parassitaria. Infine in un soggetto è stata osservata polmonite granulomatosa parassitaria. Tutte le risposte infiammatorie evidenziate nei tursiopi liberi sono caratterizzate dalla presenza di una popolazione infiammatoria prevalentemente macrofagica che nel 33% dei casi è associata a linfociti (3/9) e nell'89% (8/9) a neutrofili con concomitante presenza di eosinofili in 3 casi.

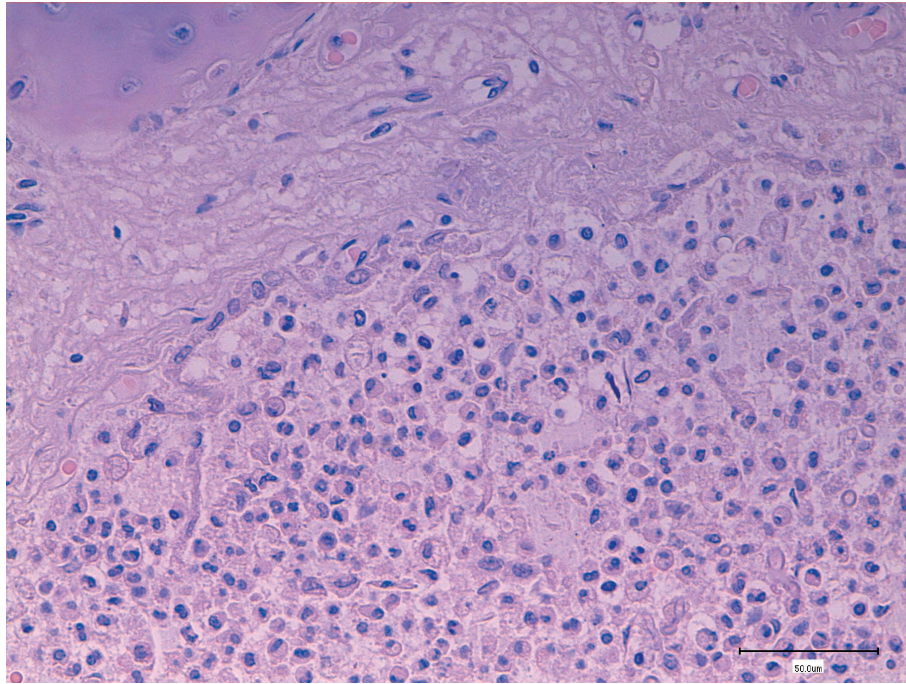


Figura 4.15: risposta infiammatoria mista a componente prevalentemente macrofagica con neutrofilii e rari eosinofili (ID 142; EE 40x)

Abbiamo individuato che nel 33% dei casi l'infestazione parassitaria era correlata ad un quadro di fibrosi.

Tabella 4.1c: analisi dei parametri dei soggetti di *S. coeruleoalba* con grado di conservazione 1, 2,3.

ID	R. inf.	Popolazione infiammatoria				Ff	Par	Batt
		M (M+cgm)	L (L+p)	N	E			
6	Bronchite cronica	+++	++	+		1		
12	PI cronica moderata multifocale	++	+			4	X	
16	BP grave multifocale cronico attiva di tipo misto	++ cgm	+++ p		+++	0		
25	BP cronica lieve	++	+ p	+		4		
26	Bronchite subacuta lieve	++		+	+	0		
30	PI cronica multifocale lieve	++	+			2		
33	Bronchite cronica moderata	+++	+			2		
34	Bronchite cronica moderata	++	+			0	x	

40	Bronchite cronica da moderata a grave	++	+++	+		0		
42	Bronchite cronica lieve con granuloma sub-pleurico, possibilmente parassitario.	+	++		++	0		
49	PI multifocale lieve	+	+			1		
85	Bronchite cronica	+	++ p	+	+	2	X	
122	P granulomatosa focale e bronchite cronica parassitarie moderata	+++	+		+	0	X	
132	Polmonite granulomatosa parassitaria	++	++		+	0	X	
140	PI lieve multifocale	++				0		
161	BP cronica grave granulomatosa parassitaria.	+++		+		0	X	G -

Su un totale di 16 soggetti di stenella caratterizzati da un grado di conservazione dei preparati istologici compreso tra 1 e 3, si osserva che il 100% è interessato da risposta infiammatoria. Come si evince dalla tabella 4.1c , il 50 % (8 soggetti) dei soggetti presenta un quadro di bronchite cronica che in 3 casi è associata alla presenza di infestazione parassitaria (Fig. 4.16).

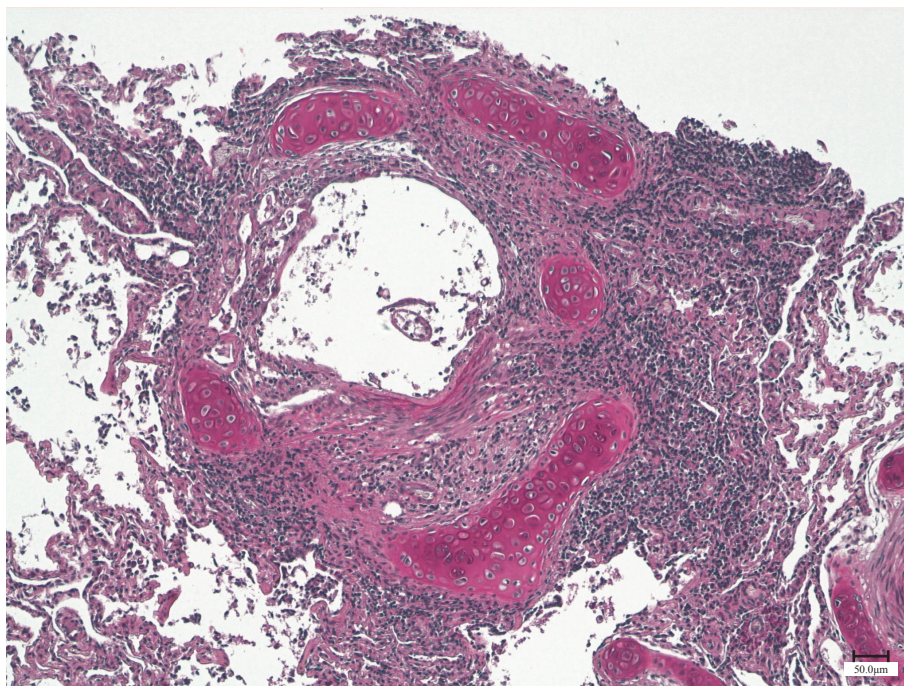


Figura 4.16: quadro di bronchiolite associato alla presenza del parassita nel lume (ID 161; EE 10x)

In altri 3 (ID 16, 26, 42) soggetti si ipotizza la presenza di parassiti data la componente eosinofila della risposta infiammatoria.

Nell'ID 161 è da segnalare l'intensa parassitosi, indice di un quadro di compromissione dell'animale. I rilievi necroscopici (deplezione linfocitaria dei centri follicolari dei linfonodi con ialinosi centro-follicolare) suggeriscono una stimolazione antigenica di lunga durata, che ha provocato nell'animale immunosoppressione (si sospetta una patologia infettiva primaria a probabile eziologia virale). Questa situazione può aver predisposto a infezioni batteriche secondarie. L'ID 12 e il 25 sono caratterizzati da un grado 4 di fibrosi con il sovvertimento della struttura anatomica caratterizzata da alterazioni del lume bronchiolare, dei rapporti tra le vie aeree ed il tessuto alveolare periferico e da lesioni erosive e infiammatorie a carico delle placche cartilaginee (Fig. 4.17).

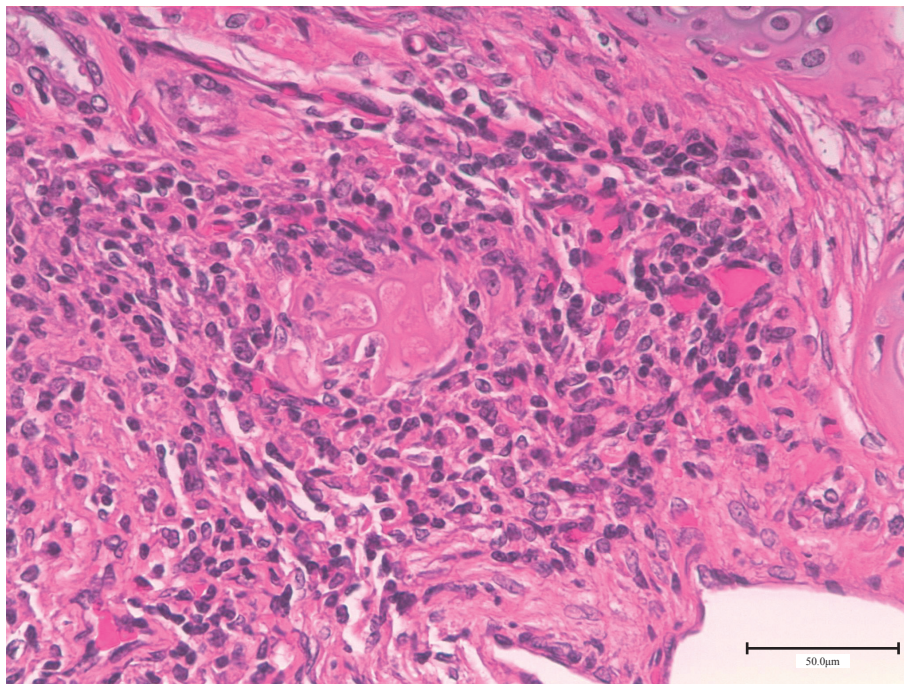


Figura 4.17: lesioni erosive e infiammatorie a carico delle strutture cartilaginee (ID 161; EE 40x)

Nelle sezioni di questi soggetti colorate con la safranina si notano anche alterazioni nella deposizione di normale matrice cartilaginea. Su un totale di 7 soggetti con alterazioni fibrotiche, solo 2 sono stati associati a presenza del parassita.

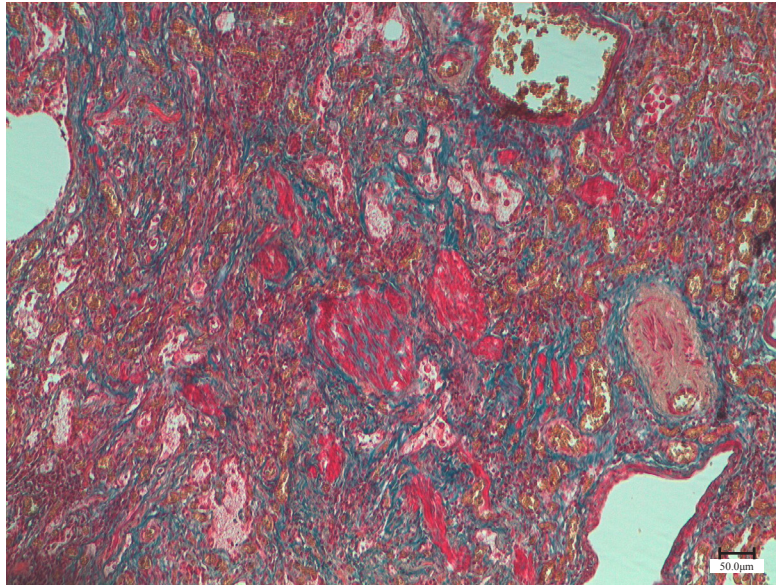


Figura 4.18: porzione di parenchima polmonare in cui il rapporto tra le strutture è stato completamente sovrastato dalla deposizione di connettivo fibroso (ID 25; Tricromica 10x).

4.6 MAS

Alla BIT sono pervenuti i tessuti di due casi (ID 114, 123) di cuccioli deceduti entro pochi giorni dalla nascita, in ambiente controllato, dove è stato possibile evidenziare la presenza di squame di cellule epiteliali cheratinizzate e di aggregati di materiale giallastro-arancione nelle vie aeree e negli spazi alveolari, riferibile a meconio, associato a blanda risposta macrofagica interstiziale, con essudazione, negli alveoli, di occasionali neutrofili ed edema abbondante (Fig. 4.19).

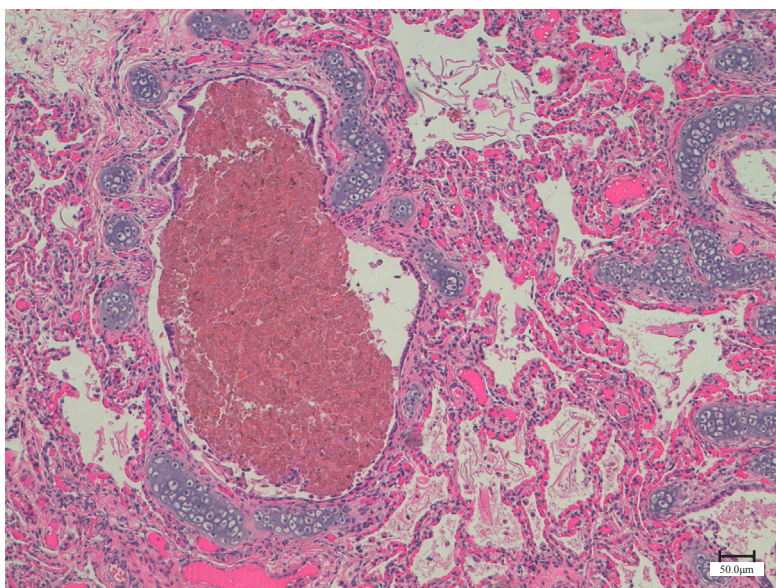


Figura 4.19: lume bronchiolare con massiva presenza di meconio e squame cheratiniche negli alveoli (EE 10x)

Dopo aver osservato tale reperto è stata effettuata un'analisi retrospettiva su tutti gli individui cuccioli e neonati o feti presenti negli archivi della banca per valutare in quanti soggetti erano presenti gli stessi rilievi, quantificando i rilievi secondo le modalità descritte nel paragrafo 3.7 (*T. truncatus*: ID 18, 36, 94, 96, 102, 114, 123 e *S. coeruleoalba*: ID 21, 22, 50). I risultati sono riportati in tabella 4.2.

Tabella 4.2: feti o neonati prelevati dalla BIT.

ID	Grado di conservazione dei preparati istologici	Squame di cheratina e cellule epiteliali (%)	Meconio (%)	Note patologiche
18	2	26%	-	Edema polmonare e congestione diffusa, infiltrato macrofagico alveolare moderato con occasionale material giallastro citoplasmatico
21	4	-	-	Calcificazioni disseminate dell'epitelio bronchiale, edema e congestion diffuse
22	4	20%	-	-
36	4	47%	-	BP cronica-attiva multifocale moderata associate ad atelettasia polmonare
50	4	28%	-	-
94	3	32%	-	Bronchite cronica diffusa moderata con broncospasmo, atelettasia e enfisema
96	2	72%	-	Immaturità polmonare fetale
102	2	61%	2%	
114	1	52%	33.5%	PI cronica attiva con presenza di meconio
123	1	49%	22%	P cronica multifocale associata a bronco costrizione, ipertrofia e iperplasia della media delle arteriole

Escludendo l'ID 21 per il grado di conservazione, in tutti gli individui sono state individuate le squame cheratiniche grazie all'uso ad'immunoistochimica utilizzando anticorpo anti-panCK, come si osserva in Figura 4.20, anche in preparati con grado di conservazione 3.

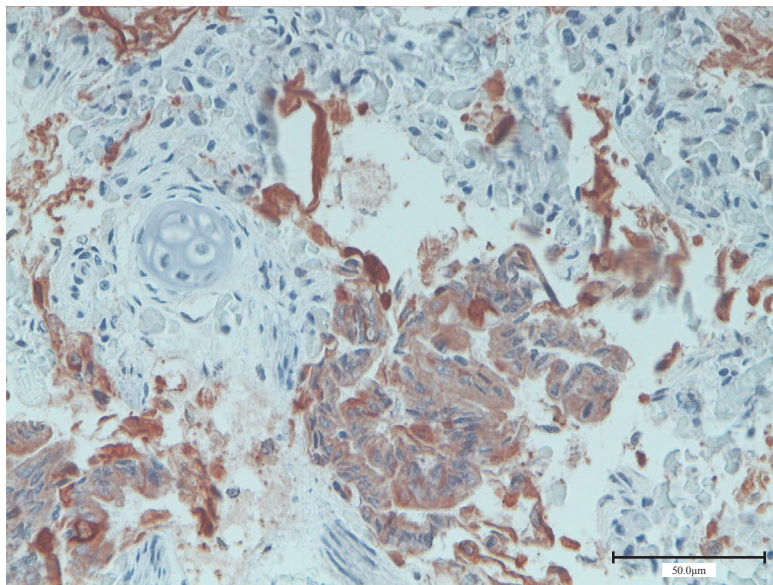


Figura 4.20: squame cheratiniche nel lume alveolare (HIM anti-panCK 40x).

Nel 30% dei 10 soggetti esaminati si osserva la presenza di squame cheratiniche e meconio. L'ID 114 e 123 presentano ipertrofia e iperplasia della parete delle piccole e medie arterie. Nei casi più gravi (ID 14, 36, 96) sono stati osservati quadri di immaturità di sviluppo del parenchima polmonare con aree di atelettasia multifocale.

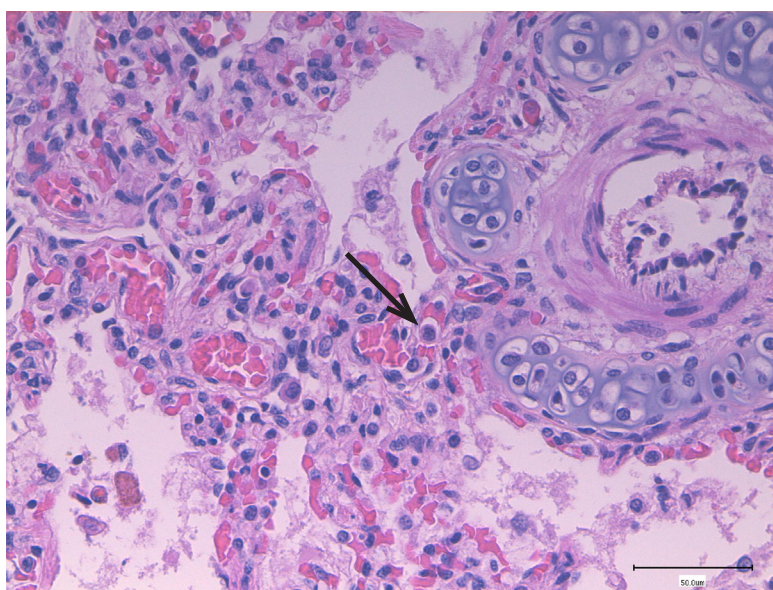


Figura 4.21: PIM (↘)in polmone di un soggetto neonato affetto da MAS (EE 40x)

4.7 Pigmentazioni e mineralizzazioni

L'antracosi è stata valutata come descritto nel paragrafo 3.7. La classe di età dei soggetti è stata approssimativamente stabilita grazie a dati morfometrici o a età stimate reperiti dalla BIT.

Tabella 4.3a: analisi dell'antracosi in funzione delle aree marine e dell'età in *T. truncatus* mantenuto in ambiente controllato.

ID	Grado	Associato a macrofagi	Area marina	Classe di età
4	4	si	AC	Anziano
20	2	si	AC	Adulto
107	3	si	AC	Adulto
133	2	si	AC	Adulto
139	3	no	AC	Adulto
146	3	si	AC	Giovane
159	3	si	AC	Anziano

Tabella 4.3b: analisi dell'antracosi in funzione delle aree marine e dell'età in *T. truncatus* a vita libera.

ID	Grado	Associato a macrofagi	Area marina	Classe di età
88	4	si	AC	Adulto
95	2	si	AS	Adulto
142	2	si	AS	Adulto
165	3	si	AS	Adulto

Tabella 4.3c: analisi dell'antracosi in funzione delle aree marine e dell'età in *S. coeruleoalba*.

ID	Grado	Associato a macrofagi	Area marina	Età presunta
6	2	si	AC	Adulto
25	3	si	TM	Adulto
34	2	no	ML	Adulto
49	3	si	ML	Adulto
85	2	no	AC	Adulto

La percentuale di soggetti che presentano particolato antracotico nell'interstizio polmonare è 43% per i tursiopi mantenuti in ambiente controllato (grado moderato), il 25% per i tursiopi a vita libera (grado moderato) e un modesto 17% per il gruppo delle stenelle (grado da lieve a moderato). Il grado di antracosi è più alto nei tursiopi, sia a vita libera, sia mantenuti in ambiente controllato, che nelle stenelle. I 16 soggetti con antracosi sono tutti adulti o anziani (il soggetto più giovane ha 3 anni). L'antracosi risulta associata a risposta macrofagica nell'81% dei soggetti (13/16) (Fig. 4.22).

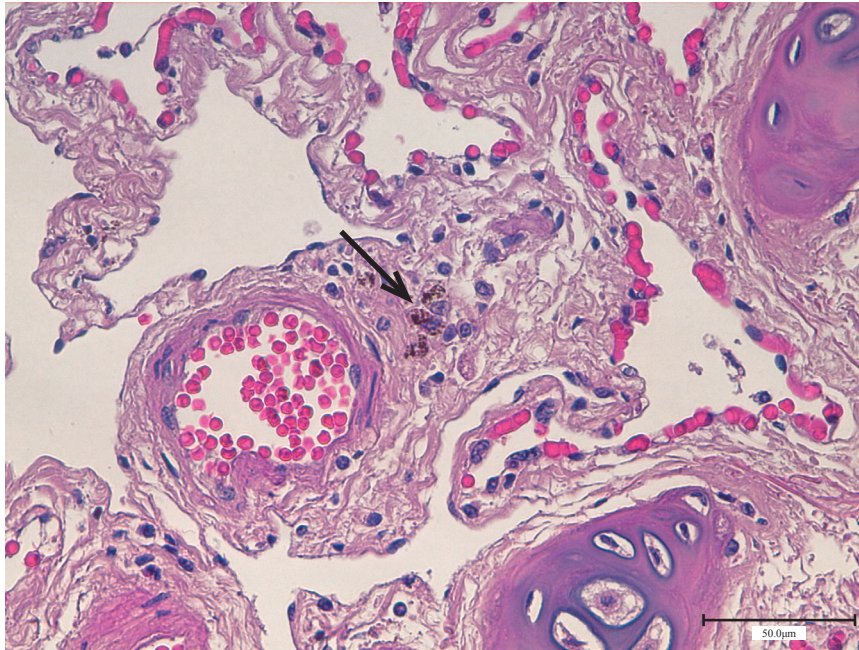


Figura 4.22: macrofagi interstiziali (↗) contenenti particolato antracitico (ID 133; EE 40x)

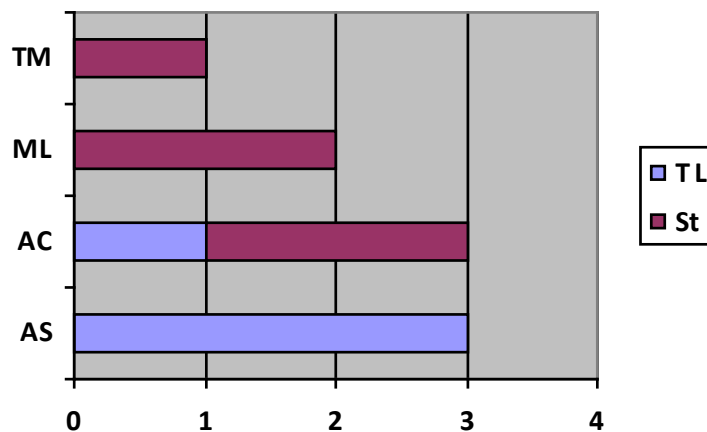


Grafico 4.4: distribuzione per aree marine dei soggetti che presentano antracosi.

Come si osserva dal grafico 4.4 il Mar Adriatico (settentrionale e centrale) è quello da cui si isolano soggetti più colpiti dall'antracosi, sia che si parli di stenelle, sia di tursiopi. Il grado medio di antracosi dei soggetti spiaggiati in Adriatico è considerato moderato, con un valore medio di 5.8 per campo ottico a 40x.

4.7.1 Corpora amilacea

In due casi (ID 139.165) abbiamo individuato la presenza di corpora amilacea negli spazi alveolari (Fig. 4.23).

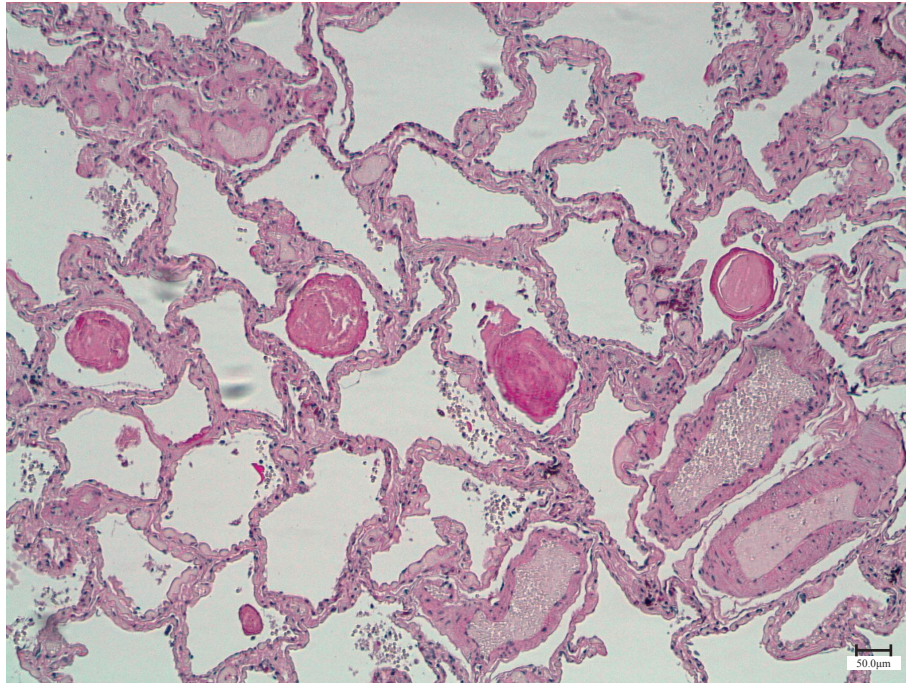


Figura 4.23: corpora amilacea negli spazi alveolari (ID 139; PAS 10x)

4.8 Descrizione dei parametri relativi ad agente eziologico

4.8.1 Agenti patogeni microbici

Nei tursiopi ad ambiente controllato non sono stati isolati o riconosciuti al microscopio ottico batteri (vedi Tab. 4.1a).

Tabella 4.4a : Campioni di tursiopi a vita libera in cui sono stati isolati patogeni batterici

ID	R. inf.	Batt	Specie
88	BP piogranulomatosa parassitaria multifocale moderata	G +	<i>Bacillus cereus</i>
110	PI cronica multifocale lieve	G -	<i>Aeromonas hydrophyla</i>
162	BP multifocale moderata	G -	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
165	BP purulenta	G -	<i>Vibrio alginolyticus</i>

Nell'ID 88 e 110 l'esame batteriologico eseguito su polmone ha permesso di isolare rispettivamente *B. cereus* e *Aeromonas Hydrophyla*. I tamponi polmonari degli ID 162 e 165 hanno evidenziato la presenza rispettivamente di *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus*. Tutti i batteri riconosciuti sono gram negativi ad eccezione di *B. cereus* e in 3 su 4 dei casi sono associati ad un quadro di broncopolmonite. Interessante notare come 3 casi su 4 (ad eccezione dell'ID 162) siano interessati da un'infezione batterica

concomitante ad infestazione parassitaria.

Tabella 4.4b : Campioni di stenella in cui sono stati isolati patogeni batterici

ID	Infiammazione	Batt	Specie
161	Bronco-polmonite cronica grave granulomatosa parassitaria.	G -	<i>Pasteurella multocida</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Chlamydia sp.</i>

Nell'unico caso di isolamento batterico da stenella tramite tampone polmonare si osserva che i patogeni implicati sono batteri opportunisti e appartengono ad animali di origine terrestre (volatili), il che fa supporre che l'infezione sia avvenuta dopo lo spiaggiamento, durante le fasi di primo soccorso prestate all'animale per 3 giorni prima del decesso. Anche in questo caso vi è una concomitante infestazione parassitaria da probabili nematodi.

Abbiamo individuato, inoltre, alcuni casi in cui negli esami collaterali della necropsia, sono stati riportati quadri di enterite con isolamento batterico e setticemia (Tab. 4.5) che, attraverso il torrente ematico, possono raggiungere il polmone.

Tabella 4.5: quadri di enterite e setticemia con isolamento batterico.

ID	Quadro patologico	Isolamento batterico
9	tossiemia	<i>Streptococcus agalactiae</i>
23	probabile setticemia	-
30	probabile setticemia	-
88	enterite	<i>Vibrio alginolyticus*</i>
89	enterococcus faecalis	<i>enterococcus faecalis</i>
110	setticemia	<i>Aeromonas hydrophila*</i>
123	possibile setticemia	<i>Aeromonas hydrophila*</i>
133	enterite	<i>Enterococcus sp</i>
139	enterite	<i>E. coli*</i>
142	enterite	<i>Enterococcus faecalis</i>
162	setticemia	<i>Vibrio parahaemolyticus*</i>
21457	setticemia	<i>Enterococcus sp.</i>

* LPS: componente della parete esterna dei batteri gram negativi

Su un totale di 10 isolamenti in cui si è potuto risalire almeno al genere di appartenenza del batterio, sono stati isolati nel 50% dei casi gram positivi e per la restante metà batteri gram negativi.

4.8.2 Infestazione parassitaria

Per determinare la presenza o l'assenza di infestazioni parassitarie abbiamo raccolto dati dall'esame necroscopico macroscopico, dall'istologia e dall'esame parassitologico di tutti i soggetti, comprendendo anche i gradi di conservazione peggiori (4 e 5) (Fig. 4.24).

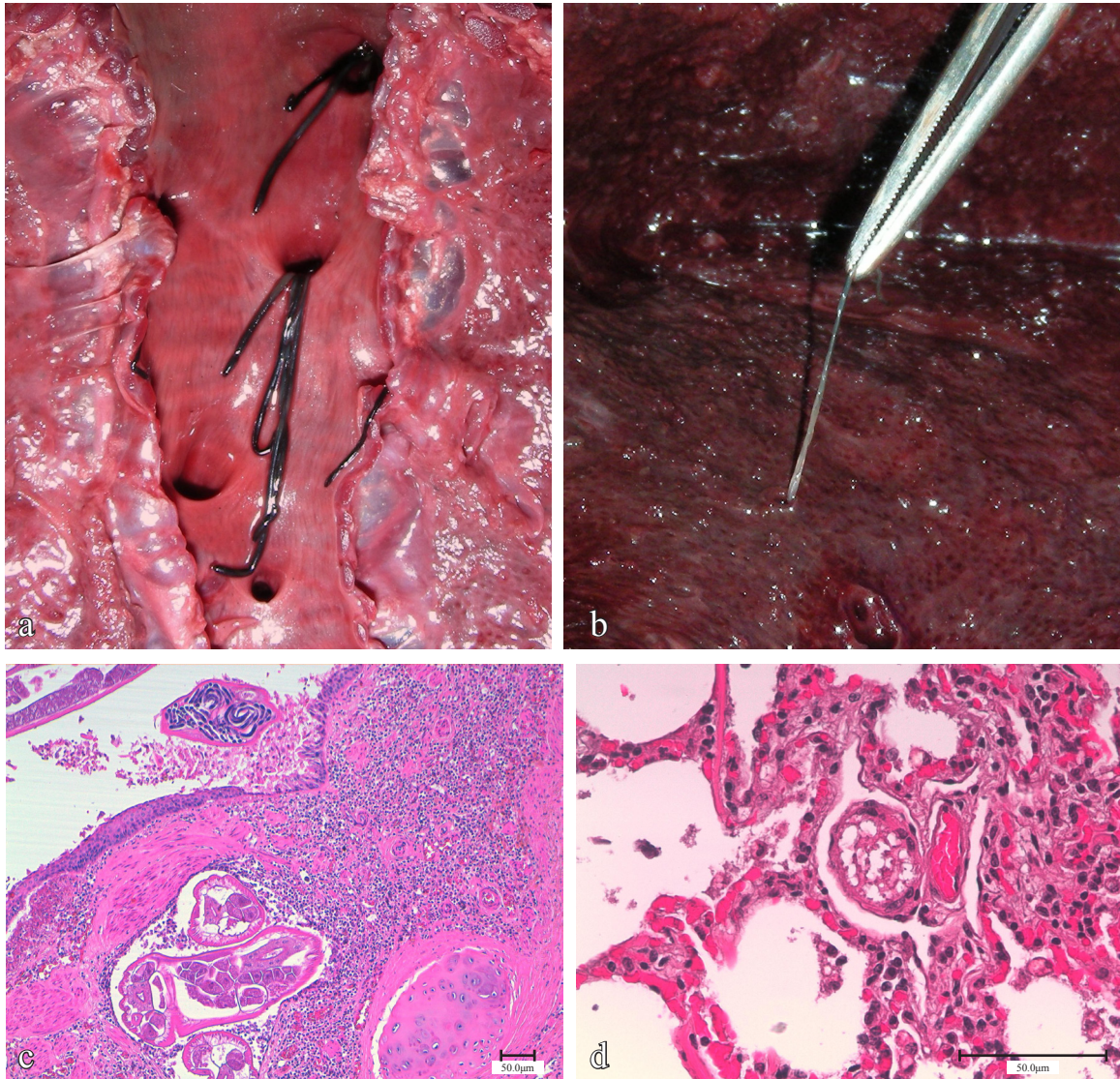


Figura 4.24 a, b, c, d: presenza di parassiti adulti nell'albero bronchiale (a), infissi nella parete dei bronchioli (b), nello spessore della mucosa bronchiolare (EE 10x; larva del lume del bronchiolo) (c) e all'interno del lume alveolare (EE 40x) (d).

In alcuni casi è stato possibile risalire alla specie parassitaria attraverso l'esame parassitologico, in altri, si è solo potuto supporre quale fosse la specie implicata in base alla localizzazione e alla morfologia. Abbiamo quindi riportato in tabella 4.6a parametri come necrosi, mineralizzazione e iperplasia o metaplasia dell'epitelio bronchiale che

rappresentano alterazioni spesso associate all'azione traumatica determinata dal passaggio del parassita.

Tabella 4.6a: campioni di tursiopi a vita libera in cui sono stati isolati parassiti

ID	R. inf.	Ff	Parassiti	Localizzazione parassiti	Necrosi/ Mineralizzazioni epitelio bronchiale	Iperplasia/metaplasia epiteliale
88	BP piogranulomatosa parassitaria multifocale moderata	4	Nematodi	intrabronchiali	X	X
95	P granulomatosa parassitaria multifocale lieve.		Pseudalidi	intrabronchiali	X	
100	BP cronica lieve		<i>Stenurus ovatus</i>	intrabronchiolare	X	
110	PI cronica multifocale lieve	2	Pseudalidi	larve nell'alveolo, Adulti intrabronchiali	X	
142	BP piogranulomatosa grave e vasculite		<i>Stenurus ovatus e Halocercus spp + Toxoplasma</i>	intrabronchiolare	X	
165	BP purulenta	3	<i>Stenurus ovatus + Toxoplasma</i>	intrabronchiolare	X	
2	-	1	Nematodi	intrabronchiali	X	
164	-	4	Possibili nematodi	Incapsulati nel granuloma	X	

Nel 50% dei soggetti a vita libera esaminati (16) è stata individuata la presenza di parassiti; tutti i soggetti interessati da parassitosi polmonare presentavano necrosi o mineralizzazioni distrofiche dell'epitelio bronchiolare; interessante notare che in 7 casi su 8 la localizzazione del parassita avveniva in sede intrabronchiale. Nel 50% dei soggetti la presenza del parassita è associata alla presenza di granulomi (Fig. 4.25). Per quanto riguarda l'identificazione delle specie parassitarie, sono stati riconosciuti membri appartenenti alla Fam. *Pseudaliidae* (5 soggetti su 8 parassitati) e in particolare *Stenurus ovatus* (37%) e *Halocercus spp* (12%). In 2 casi si è solo potuto indicare il coinvolgimento di nematodi. Nell'ID 142 e 165 oltre agli pseudalidi è presente una concomitante infezione da *Toxoplasma*. Nel 62% dei soggetti

con infestazione parassitaria è stata individuata la presenza di fibrosi di grado da moderato a grave. Solo in un caso è stata descritta iperplasia e metaplasia dell'epitelio come si vede nella figura 4.1 dell'ID 88.

All'esame macroscopico dell'ID 2 è stato individuato un nodulo delle dimensioni di una capocchia di spillo di colore biancastro; inoltre la microscopia ci ha permesso di osservare strutture multiple a sezione rotondeggiante all'interno dei bronchi di calibro maggiore riferibili a parassiti (possibili nematodi).

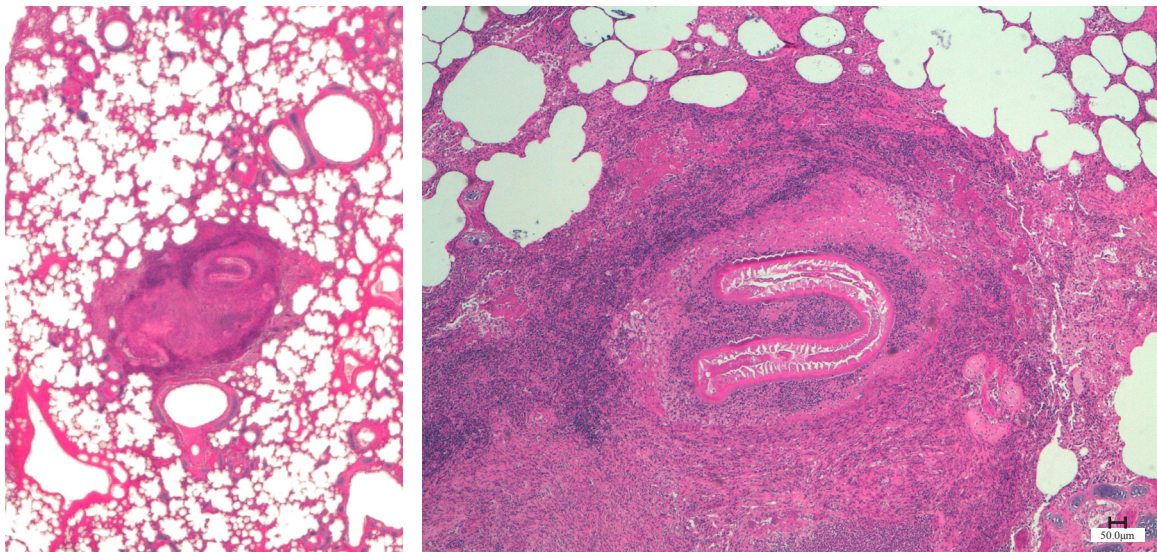


Figura 4.25: granuloma parassitario nel parenchima polmonare (EE) e suo particolare (ID 122; EE 5x).

Macroscopicamente l'ID 164 presentava un quadro di grave polmonite parassitaria con granulomi nel tessuto polmonare. All'istologia è stata confermata la polmonite parassitaria associata a numerose mineralizzazioni e fibrosi del tessuto interstiziale polmonare.

Tabella 4.6b: Campioni di stenelle in cui sono stati isolati parassiti

ID	R. inf.	Ff	parassiti	Localizzazione parassiti	Necrosi/mineralizzazioni epitelio bronchiale
12	PI cronica moderata multifocale a eziologia parassitaria	4	<i>Skrjabinalius guechevari</i>	intrabronchiali	X
85	Bronchite cronica moderata	2	possibili nematodi	1 granuloma in sede paravasale	X
122	P granulomatosa parassitaria moderata focale		nematodi	intrabronchiale	X

132	Granuloma parassitario		Possibili nematodi		X
161	BP cronica grave granulomatosa parassitaria.		possibili nematodi	intrabronchiale	X
7	-	4	Nematodi	intrabronchiali	
22	-		possibili nematodi	Incapsulati nel granuloma	
23	-	3	possibili nematodi		X

Il 27% delle stenelle totali presentavano infestazione parassitaria (Tab. 4.6b) che nel 37% dei casi è associata a fibrosi. In 2 di questi casi la fibrosi è di grado 4 (ID 12 e 7) che generalmente è associato a sovvertimento della struttura polmonare. Importante segnalare che il 75% di tutti i soggetti con parassitosi polmonare e il 75% di quelli in cui è stata individuata la localizzazione intrabronchiale presentano necrosi o mineralizzazioni dell'epitelio bronchiale. Nel 62% la presenza del parassita è associata alla presenza di granulomi. Reperti particolari come iperplasia/ipertrofia e mineralizzazione degli sfinteri mio elastici sono stati descritti nei casi ID 12, 85, 132. Segnaliamo nell'ID 122 la presenza di mineralizzazioni cartilaginee. Infine nell'ID 132 e 161 si osserva una marcata riduzione del lume bronchiolare con ispessimento degli sfinteri muscolari che sono compatibili con una condizione di broncospasmo. L'esame macroscopico dell'ID 7 indica la presenza di parassiti in prossimità della biforcazione bronchiale; sono descritti come organismi bianchi, a sezione circolare, con un diametro di circa 0.5mm e di lunghezza variabile tra i 2 e i 5 cm, possibilmente riferibili a nematodi. Nell'ID 22 alla microscopia i parassiti vengono descritti come elementi tubulari, dotati di una parete propria di materiale ialino, delle dimensioni approssimative di 500 x 20 x 80 µm. Nell'ID 23 si rileva inoltre una formazione nodulare, a possibile eziologia parassitaria, caratterizzata da una parete formata da fasci connettivali paralleli disposti concentricamente.

Nel grafico 4.5 abbiamo provato a valutare la distribuzione geografica degli animali con parassiti polmonari. Si nota come la maggior parte dei soggetti (62%) appartengono al bacino del Mar Adriatico.

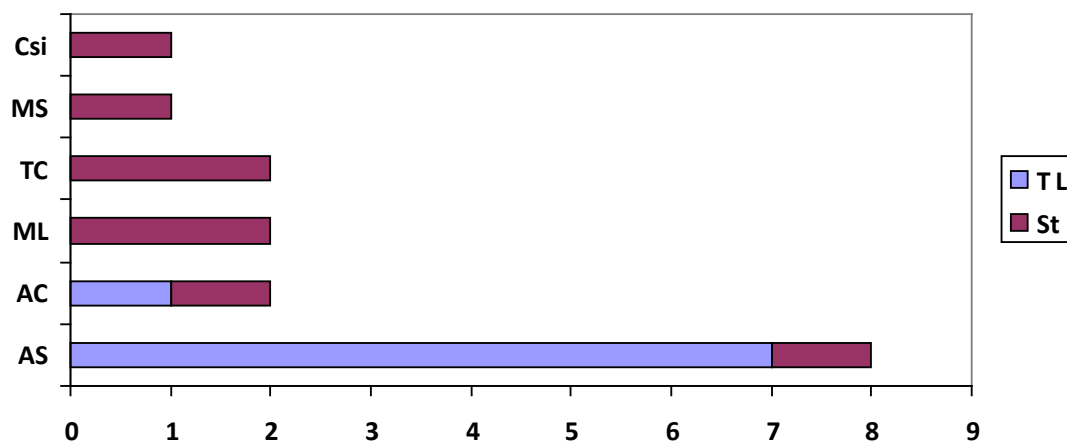


Grafico 4.5: distribuzione soggetti con parassitosi polmonare

4.8.3 Infezioni micotiche polmonari

Tabella 4.7: infezione micotica e vasculite

ID	Presenza miceti	Vasculiti
107	<i>Candida tropicalis</i>	-
142	<i>Candida sp.</i>	x

L'ID 107, un soggetto adulto maschio di 250 cm di lunghezza mantenuto in ambiente controllato, presenta un quadro di broncopolmonite granulomatosa multifocale grave. La popolazione infiammatoria è mista a prevalenza macrofagica; all'interno dei focolai infiammatori peribronchiali, interstiziali e alveolari si osservano aree di necrosi. La sezione di tessuto polmonare è stata sottoposta a colorazione particolare Grocott ma, all'istologia, non sono state individuate ife o spore fungine nonostante il tampone polmonare risultasse positivo a *Candida tropicalis*. L'ID 142 è una femmina adulta (276 cm) piaggiata a Jesolo nel 2008 che presentava un quadro di broncopolmonite piogranulomatosa grave (Fig. 4.26) associata a vasculite e trombi micotici con individuazione all'istologico di un'abbondantissima presenza di ife fungine ascrivibili a *Candida sp.* L'ipotesi si basa su un'attenta osservazione delle caratteristiche morfologiche del fungo; si individuano infatti ife pseudosettate e presenza di lieviti di forma ovalare di 3-8 µm di diametro, in accordo con quanto riportato in letteratura.

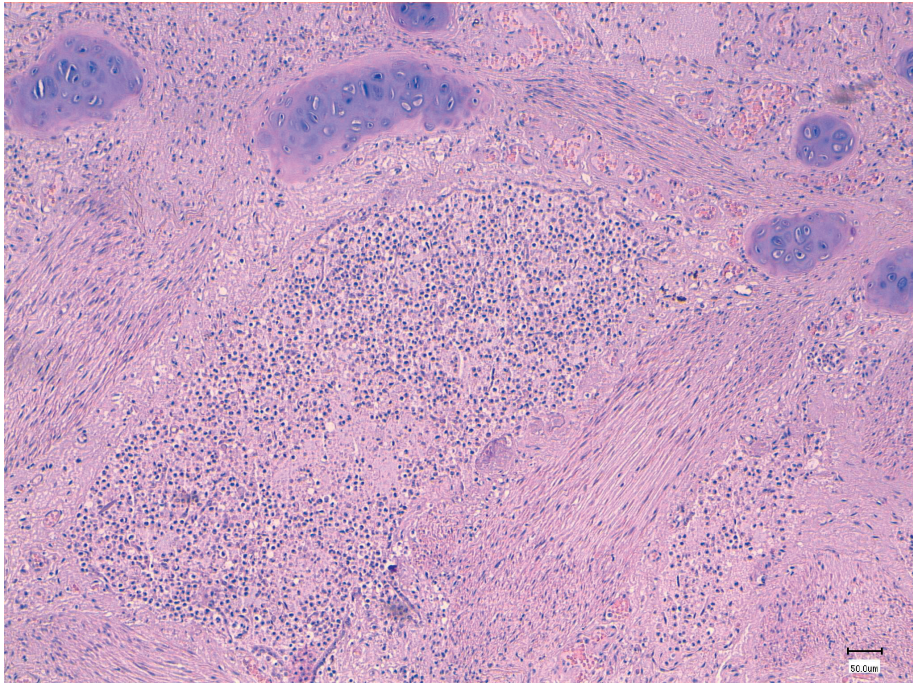


Figura 4.26: quadro di broncopolmonite micotica grave (ID 142; EE 10x)

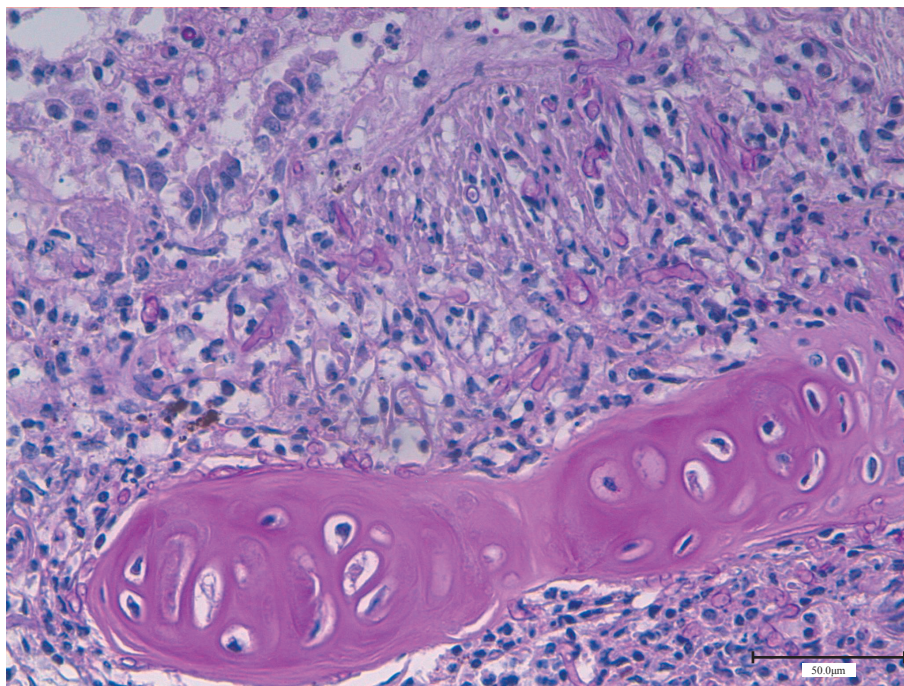


Figura 4.27: ife fungine nello sfintere mio elastico di un bronchiolo (EE 40x)

5 DISCUSSIONE

I risultati ottenuti riguardo alla distribuzione degli spiaggiamenti dei soggetti a vita libera delle due specie prese in esame sono compatibili con i dati raccolti in letteratura riguardo a distribuzione mediterranea e spiaggiamenti (Cagnolaro et al., 1983; Randall et Scott, 2002; Notarbartolo di Sciara e Demma, 2004). Dai dati raccolti si evince che la distribuzione degli spiaggiamenti di tursiopi e stenelle dipende dalle aree marine in cui le due specie sono più presenti, rispettivamente il Mar Adriatico e il Mar Ligure (Notarbartolo di Sciara e Demma, 2004).



Abbiamo individuato differenze importanti riguardanti il grado di conservazione dei campioni di tessuto polmonare nei tre gruppi (tursiopi mantenuti in ambiente controllato, tursiopi a vita libera e stenelle). Si è visto infatti che i tessuti provenienti da tursiopi mantenuti in ambiente controllato, hanno un grado di conservazione migliore, dei campioni raccolti da animali a vita libera (rispettivamente il 100% e il 55% presentano un grado di conservazione compreso tra 1 e 3). Tale differenza trova spiegazione nel fatto che, difficilmente, i soggetti spiaggiati vengono sottoposti a esame necroscopico e prelievi istologici in tempi adeguati o seguendo procedure necroscopiche e di campionamento corrette. Al contrario, gli oceanari e i delfinari, necessitando di una rapida e corretta diagnosi *post-mortem* per non mettere a repentaglio la salute dei cetacei vivi mantenuti in cattività, inviano le carcasse dei soggetti deceduti al laboratorio necroscopico entro tempi brevi. Questi campioni rappresentano prezioso materiale di studio per la BIT, soprattutto per gli esami che richiedono dei tessuti esenti da processi autolitici o fermentativi (studi anatomici, immunoistochimici, fisiologici e fisiopatologici). La collaborazione con strutture che mantengono gli animali in cattività fa sicuramente emergere problemi di natura etica, ma da un punto di vista scientifico permette di ottenere un campione di valore, in quanto spesso esente da patologie spontanee presenti nei soggetti a vita libera, come parassitosi e contaminazioni ambientali. Per quanto riguarda, invece, il confronto dello stato di conservazione dei preparati istologici delle due specie a vita libera, non si sono riscontrate differenze di rilievo tra le due specie considerate (tursiopi 56%, stenelle 55%).

In un periodo che va dal 2000 ad oggi, solo il 5,4% del totale dei soggetti di tursiopi e stenelle spiaggiati lungo le coste italiane sono pervenuti alla BIT. Quando un animale spiaggia, difficilmente vengono infatti allertate le autorità di competenza quali ASL e/o IZS, Polizia municipale, Guardia Costiera, Musei e/o Istituzioni locali, Istituzioni nazionali di riferimento (Banca Italiana Tessuti Mammiferi Marini, Università di Padova). Questo può implicare una campionatura insufficiente o poco significativa degli organi alla necroscopia (assenza di diagnosi macroscopica, alterato rapporto formalina/sezione di tessuto, non riconoscimento delle aree di organo che presentano una lesione, mancata effettuazione di tamponi o prelievo di essudati o trasudati). Per la validità delle successive indagini diagnostiche, infatti, è di fondamentale importanza che il materiale sia prelevato

da personale tecnico competente. A supporto di quanto affermato sopra, si nota come, prendendo in considerazione gli animali considerati in questo studio, solo il 75% dei tursiopi mantenuti in cattività, il 62% di quelli a vita libera e il 31% delle stenelle hanno un esame necroscopico completo di esame macroscopico e istologico associati ad indagini collaterali per stabilirne la causa del decesso.

In questo lavoro si è notato che all'esame macroscopico dei polmoni di cetacei, considerando sia il materiale fotografico di archivio, sia organi valutati durante esame *post-mortem*, esiste una limitata variabilità di lesioni, anche quando sono stati isolati agenti patogeni poi ritenuti causa del decesso o dello spiaggiamento. Generalmente, infatti, appaiono evidenti quadri patologici riferibili a disordini cardiocircolatori e reperti infiammatori cronici, soprattutto parassitari, o esiti cicatriziali. Raramente, invece, abbiamo osservato quadri riferibili a processi essudativi o emorragici, questi ultimi indicativi, negli animali terrestri, di quadri setticemici o endotossici acuti. Riteniamo quindi che, alla luce di queste osservazioni, sia fondamentale effettuare indagini microscopiche ed eventuali esami collaterali per poter emettere una corretta diagnosi patologica. Da sottolineare, ad esempio, come il polmone possa essere utilizzato nella diagnosi di collisione, proprio in questi animali, evidenziando la presenza di emboli lipidici nei capillari polmonari, utilizzando una tecnica di post-fissazione en-bloc in tetrossido d'osmio (Godinho *et al.*, 2006).

Relativamente alle peculiarità anatomiche osservate, in letteratura è riportato che la porzione cranio-ventrale del polmone sinistro dei tursiopi e di altri piccoli odontoceti è talvolta molto sottile, simile ad un velo, nel punto in cui ricopre il cuore (Rommel et Lowenstine, 2001). Di contro, nella nostra indagine, si è visto come questa alterazione fosse presente in alcuni soggetti su entrambi i polmoni e caratterizzata dalla presenza delle sole vie aeree con aplasia/ipoplasia del tessuto alveolare. Il reperimento di ghiandole nella mucosa bronchiale, come ritrovato nel nostro ID159, è evento raro anche in letteratura (Ridgway, 1972).

Da un punto di vista patologico, come riportato da molti autori, i polmoni rappresentano l'organo più colpito da lesioni nei cetacei ed in particolare da processi infiammatori, prevalentemente ad eziologia parassitaria. Tutti i parassiti riconosciuti appartengono alla classe dei nematodi, in accordo con quanto riportato da Jepson *et al.* (2000) e in particolare

al genere *Pseudalidae* (*Stenurus ovatus*, *Halocercus* sp., *Skrijabinalius guechevari* sia singoli sia combinati tra loro). I parassiti, nonostante provochino gravi danni tissutali, non rappresentano direttamente una minaccia per la sopravvivenza dell'individuo (Cornaglia *et al.*, 2000; Mazzariol *et al.*, 2007). Queste osservazioni generali sono confermate anche nel nostro studio in cui si rileva che un quadro infiammatorio polmonare è presente in tutti i soggetti a vita libera con isolamento parassitario nel 89% dei tursiopi e nel 50% delle stenelle. Il fatto che le stenelle risultino meno affette da infestazioni parassitarie potrebbe essere dovuto sia al campionamento scorretto o alla scarsa conservazione del tessuto sia a fattori dipendenti dal diverso habitat che verranno trattati successivamente in funzione dell'areale marino.

In tutti i cetacei che abbiamo analizzato la risposta infiammatoria è cronica e caratterizzata da una preponderante componente macrofagica associata nel 23% dei casi a fibrosi. In medicina umana è stato dimostrato che alcuni attivatori dei macrofagi alveolari (LTB4 e IL-8) che promuovono e modulano la risposta infiammatoria, sembrano anche essere correlati alla fibrogenesi (Reynolds, 2004). Inoltre i macrofagi stessi producono alcune citochine profibrogeniche che stimolano la deposizione del tessuto connettivo. La fibrosi e l'infiltrazione macrofagica nei cetacei sembrano quasi provvedere all'isolamento della porzione di parenchima polmonare danneggiato, determinando generalmente una distribuzione multifocale o lobulare. Nei cetacei la risposta infiammatoria polmonare si presenta macroscopicamente con un quadro prevalentemente lobulare. Ricordando la funzione degli sfinteri mioelastici disposti a brevi intervalli tra anelli di cartilagine successivi e in grado di dividere i bronchioli terminali in una serie di compartimenti (Ridgway, 1972) e notando un ruolo attivo degli sfinteri (attraverso la bronco costrizione) nei quadri patologici si può ipotizzare che questi impediscano la diffusione del processo patologico alla restante parte del parenchima. Per quanto riguarda i parassiti, si conferma l'assenza di infestazione negli animali mantenuti in ambiente controllato.

La risposta dei macrofagi polmonari, parzialmente descritta in precedenza quando attivata da patogeni presenti nel tessuto polmonare, può essere stimolata anche nei cetacei da condizioni di endotossitemia. In particolare nei cetacei, come in altre specie di mammiferi terrestri, sono stati descritti i macrofagi intra-vascolari nel parenchima polmonari (PIM)

(Kawashima *et al.*, 2004). In presenza di tossine circolanti derivanti da batteri gram negativi (LPS), possono attivarsi, indurre un danno polmonare attraverso il rilascio di mediatori dell'inflammation (Chen *et al.*, 2003; DeCamp *et al.*, 1992; Gaca *et al.*, 2003) e assumere un ruolo determinante nella progressione di lesioni polmonari infettive fatali (Winkler, 1988; Kawashima *et al.*, 2004; Gill, 2008). I quadri infiammatori polmonari e l'azione dei PIM sono simili a quelli osservati nei bovini, filogeneticamente correlati ai cetacei. L'iperemia rappresenta, probabilmente, un'alterazione di minor importanza ma di riscontro frequente. Viene descritta come un processo attivo facente parte della risposta infiammatoria mentre, la congestione, come un processo passivo causato dal diminuito efflusso di sangue venoso (insufficienza cardiaca congestizia) (Lopez, 2007). Quest'ultimo è più frequentemente associato ad edema e fuoriuscita degli eritrociti negli spazi alveolari che vengono rapidamente fagocitati dai macrofagi alveolari (emosiderofagi) che si possono osservare anche negli spazi bronco alveolari (heart failure cells). Durante l'osservazione dei nostri campioni l'edema risulta spesso associato ad iperemia e ad iperemia con emorragie suggerendo quindi una causa cardiogena; le emorragie a loro volta sono associate alla presenza di emosiderofagi in poco meno della metà dei casi; un'ulteriore spiegazione sta nel fatto che l'edema, provocando la distensione delle pareti alveolari, causa la rottura delle pareti dei capillari. Le forme cardiogene sono spesso associate ad ipertrofie delle cellule muscolari lisce dei piccoli vasi arteriosi e fibrosi della parete alveolare (Lopez, 2007) infatti, nel 17% dei nostri campioni con edema, questo è associato a ipertrofia dell'endotelio vasale. Queste osservazioni suggeriscono che l'iperemia che spesso si osserva nel parenchima polmonare dei cetacei derivi da una disfunzione cardio-circolatoria ed, essendo pochi i casi in cui è stata osservata la presenza di emosiderofagi e di alterazioni vascolari, è plausibile pensare che sia un reperto acuto, probabilmente connesso con l'evento dello spiaggiamento. Nei soggetti a vita libera, l'infezione parassitaria risulta prevalentemente associata ad un processo infiammatorio granulomatoso (56%) e in minor misura a broncopolmonite cronica. Nella metà dei casi in cui è stato individuato un quadro di broncopolmonite cronica è stata osservata una coinfezione di parassiti e batteri. Gli adulti dei parassiti osservati nei campioni hanno tutti localizzazione intrabronchiale. Questo comporta generalmente (87% dei soggetti) un danno diretto all'epitelio bronchiale e bronchiolare caratterizzato da necrosi

e mineralizzazioni. Nel caso in cui la stimolazione traumatica sia persistente, sembra che la presenza dei parassiti determini iperplasia e metaplasia squamosa dell'epitelio della mucosa e la deposizione di connettivo che appare alterare la morfologia delle strutture respiratorie. Queste alterazioni provocano verosimilmente una perdita delle difese fisiche aspecifiche e predispongono ad infezioni batteriche secondarie, possibilmente veicolate dal parassita stesso (Dawson *et al.*, 2008). Questa osservazione sembra supportata anche dall'isolamento dei patogeni batterici isolati dai nostri campioni. Per quanto i dati siano scarsi in relazione al basso numero di necroscopie (11% del totale degli animali a vita libera), essi sono generalmente tutti patogeni opportunisti e, nella maggior parte dei casi sono associati a parassiti con evidente danno alle vie respiratorie.: ad esempio abbiamo riportato due casi di infezione polmonare da *Vibrio* sp. normale residente nello sfiatatoio dei cetacei. Questi batteri e altri isolati dai polmoni di animali a vita libera sono inoltre potenziali agenti zoonosici per gli operatori impiegati negli esami *post-mortem* e quindi il loro isolamento enfatizza la necessità di adottare precauzioni durante le necroscopie effettuate sugli animali marini. Ancora da segnalare che solo in un caso di stenella sono stati isolati patogeni sia dal tessuto polmonare sia da emocoltura come *Clamidia* sp. o *Pasteurella multocida*, agenti patogeni di animali terrestri o volatili che sembrano aver infettato l'animale durante le ultime fasi della vita, probabilmente durante le operazioni di recupero (l'animale era spiaggiato vivo ed è deceduto dopo tre giorni di terapia). Questo singolo caso sottolinea la necessità di porre attenzione agli aspetti igienico-sanitari durante queste operazioni.

Segnaliamo, inoltre, due casi di infezione fungina in due tursiopi, uno a vita libera ed uno in ambiente controllato, sostenute da miceti opportunisti. . La frequenza delle infezioni fungine nei cetacei risulta nettamente inferiore rispetto a quella causate da batteri, virus e parassiti. *Candida* sp., segnalata in entrambi i casi descritti nel nostro studio, risulta essere la specie fungina maggiormente implicata nelle infezioni dei cetacei (Mouton *et al.*, 2009). All'interno del tratto respiratorio dei cetacei sani, si può osservare spesso la presenza di questo patogeno senza che ciò rappresenti un problema per l'ospite, a meno che non esista una condizione di immunodepressione (Sweeney et Reddy, 2001). In questo caso, *Candida* sp. forma pseudoife che invadono i tessuti. Nel caso del tursiope a vita libera, il quadro di

immunodepressione era confermato anche dalla co-infezione di vari tessuti, compreso quello polmonare, da parte di *Toxoplasma gondii*. Nel soggetto mantenuto in ambiente controllato, invece, l'infezione micotica risulta essere spia di un quadro di immunocompromissione: in questo caso la necropsia e le indagini collaterali hanno escluso possibili agenti infettivi e quindi bisogna ricercare altre possibili cause per la compromissione del sistema immunitario. In entrambi i soggetti abbiamo osservato un quadro di broncopolmonite granulomatosa o piogranulomatosa grave a componente mista prevalentemente macrofagica con vasculite e trombi micotici nel lume dei vasi. Questo pattern di lesione trova riscontro anche nei precedenti studi di Jepson *et al.* (2000), Reidarson *et al.*, (1998), Jensen *et al.* (1998) e in letteratura (Lopez, 2007)

Come emerge in tutta l'indagine eseguita, nei tursiopi mantenuti in ambiente controllato, l'incidenza delle patologie polmonari è piuttosto bassa (69%), soprattutto in considerazione dell'assenza di quadri parassitari o batterici. L'unica segnalazione importante è la già citata broncopolmonite micotica. E' però da segnalare la presenza di meconio nelle vie aeree e nel tessuto polmonare di tre cuccioli, derivanti appunto da oceanari. Questi reperti istopatologici con la flogosi associata hanno permesso di diagnosticare una sindrome da aspirazione del meconio (MAS). Questa è una condizione che si verifica quando il liquido amniotico contaminato con il meconio viene aspirato dal feto durante il parto o immediatamente dopo la nascita. L'ipossia fetale, evento comune durante la distocia o un travaglio prolungato, provoca il rilascio di meconio da parte del feto nel liquido amniotico. L'aspirazione può avvenire direttamente aspirando il liquido amniotico contaminato prima del parto (movimenti respiratori con la glottide aperta) (Kobayashi *et al.*, 2008) o subito dopo il parto quando il meconio, sito nel nasofaringe, arriva ai polmoni durante il primo tentativo respiratorio. La MAS è ben conosciuta negli umani neonati, ma la frequenza e il significato negli animali rimane poco conosciuto (Lopez, 2007). La MAS è stata descritta in vitelli, suini, puledri e topi e raramente in altre specie (Vaala, 1999; Zagariya *et al.*, 2000). Nei mammiferi marini è stato descritto solo un caso di un *T. truncatus* neonato, mantenuto in cattività, deceduto per una setticemia da *E. coli* secondaria a MAS (Van Elk *et al.*, 2007). Sebbene le lesioni polmonari siano generalmente lievi e temporanee, possono rappresentare un pericolo per la vita del neonato perchè accompagnate da ipossia e acidosi e possono

essere seguite da ipertensione polmonare e da possibile iper reattività delle vie aeree. Nei casi più gravi, atelettasie focali irregolari sono osservabili macroscopicamente e indicano l'impossibilità del polmone di aerearsi completamente a causa dell'ostruzione meccanica e degli effetti chimici del meconio sul surfattante polmonare. Microscopicamente, il meconio e la cheratina esfoliata dall'epidermide, contenuti nel liquido amniotico, sono osservabili nei bronchi, bronchioli e alveoli accompagnati da lieve alveolite, caratterizzata da infiltrato leucocitario, macrofagi alveolari e occasionali cellule giganti multinucleate. Nei nostri soggetti, è impossibile stabilire quale sia il fattore materno che abbia causato la MAS. Sicuramente questo ha indotto una situazione di debolezza che, come si evince dai referti necroscopici, ha predisposto per infezioni secondarie o quadri setticemici. L'indagine retrospettiva effettuata in seguito ha esaltato la presenza di squame cheratiniche in tutti i soggetti considerati neonati o cuccioli, la cui presenza è quindi da considerarsi reperto caratteristico fisiologico in tali classi di età. Molto probabilmente le squame cheratiniche derivano dalla normale esfoliazione della cute o delle primissime vie respiratorie nel feto. Anche descrivendo i reperti relativi alle variazioni del contenuto d'aria emergono differenze tra le due specie a vita libera prese in considerazione. Abbiamo infatti notato che l'enfisema nelle stenelle si presenta in grado più grave rispetto agli altri gruppi di studio. Non abbiamo trovato una spiegazione plausibile in letteratura, ma è ragionevole cercarla negli aspetti biologici della specie ed, in particolare, dove vive l'animale: essendo infatti animali pelagici, il decesso avviene probabilmente per annegamento che, generalmente, appare caratterizzato da quadri di enfisema più gravi. Nei soggetti esaminati non è stato trovato materiale esogeno nelle vie aeree (tranne in un caso) e quindi non è possibile emettere una diagnosi di annegamento sulla base del semplice esame istologico. L'annegamento è una delle diagnosi più difficili della patologia forense poiché si innescano vari meccanismi che conducono alla morte quali ipossia da aspirazione di acqua, laringospasmo e disturbi elettrolitici (Zhu *et al.*, 2003). La diagnosi di annegamento necessita di esami autoptici, analisi microscopiche, test biochimici ma non può mai basarsi solo sui reperti patologici (Lorin de la Grandmaison et Paraire, 2003). Ad oggi, in umana, la combinazione di reperti autoptici e test delle diatomee rappresenta un buon compromesso per raggiungere una diagnosi (Piette et De Letter, 2006). Macroscopicamente è significativa la presenza

di edema schiumoso nelle vie aeree contenente macrofagi alveolari (Betz *et al.*, 1993) e polmoni aumentati di volume e di peso (dovuto a congestione polmonare, edema causato da ipervolemia, ipoproteinemia e danni microvascolari polmonari) associati a versamento pleurico (può subire un ulteriore aumento per trasudazione post mortem che dipende a sua volta dall'acqua contenuta nei polmoni e dall'intervallo morte-autopsia) (Zhu *et al.*, 2003). La quantità di versamento pleurico nell'annegamento pare essere direttamente correlata all'edema polmonare al momento della morte e all'effetto osmotico determinato dall'immersione nel mezzo (acqua salata o dolce) (Zhu *et al.*, 2003). I polmoni aumentano di peso nello stesso modo sia nell'annegamento in acqua dolce sia in acqua salata (Locali *et al.*, 2006). L'incremento dei macrofagi è maggiore nell'annegamento in acqua salata rispetto a quello in acqua dolce (Locali *et al.*, 2006). Nei cetacei non è però noto se il controllo della respirazione e quindi il controllo dello sfiatatoio e degli atti respiratori sia volontario o controllato sulla base della pressione parziale ematica dell'anidride carbonica e quindi è difficile capire se la prolungata apnea, oltre i limiti fisiologici, determini un annegamento umido, per atti respiratori involontari o ad una condizione di asfissia determinata dalla chiusura prolungata e volontaria delle vie aeree. La difficoltà di diagnosticare l'annegamento è aumentata dall'afflusso di acqua di mare nelle vie aeree dopo la morte. E' quindi necessario ricercare materiale esogeno nelle vie aeree profonde nei lobi caudali, come diatomee e cristalli di sale (ID122), anche con tecniche molecolari. Püschel *et al.* (1999) hanno proposto, in medicina umana, un criterio aggiuntivo per la diagnosi di annegamento che consiste nell'individuazione di emorragie intramuscolari (muscoli respiratori del collo e della parte superiore della cassa toracica), che trovino riscontro anche nell'istologia, in assenza di ematomi a livello di cute e di strato adiposo sottocutaneo.

Considerando la distribuzione degli animali secondo gli areali marini del Mar Mediterraneo e le differenze di habitat tra tursiopi e stenelle, possiamo formulare ulteriori considerazioni. Il maggior numero di soggetti affetti da parassitosi (62%) deriva dal bacino dell'Adriatico e sono prevalentemente tursiopi. Esistono numerose possibili spiegazioni tra cui la domestichezza dei tursiopi con l'ambiente costiero che li rende particolarmente vulnerabili all'inquinamento e al conseguente indebolimento delle risposte immunitarie (Notarbartolo di Sciara *et Demma*; 2004), l'alta densità di popolazione degli animali in Adriatico che

favorisce la trasmissione dell'agente patogeno (non esistono però stime di popolazione in questo bacino); l'ipotizzata presenza di vettori (pesci) inseriti nella catena alimentare dei tursiopi (libro nella macchina foto) ed infine lo scarso ricambio delle acque del bacino. Nelle stenelle, la minor individuazione dei parassiti è imputabile al fatto che questa specie trascorre gran parte della sua esistenza in mare aperto (prevalentemente nel Mar Ligure), dove le correnti creano un ambiente sfavorevole all'espletamento del ciclo biologico del parassita.

Esistono differenze sostanziali anche per quanto riguarda la distribuzione dell'antracosi, è da segnalare innanzitutto la prevalenza nei soggetti mantenuti in ambiente controllato (43%) rispetto a quelli a vita libera (21%). Le polveri di carbone sono ubiquitarie nell'ambiente, ma più concentrate sulla terra ferma rispetto alle zone marine dove le polveri tendono a precipitare. Si osserva inoltre che il 67% dei soggetti (prevalentemente tursiopi) con antracosi appartengono al bacino dell'Adriatico mentre solo il 37% al Tirreno. Essendo questi ultimi prevalentemente stenelle, tendono a vivere e muoversi molti più lontano dalle coste con areali di migrazione maggiori. L'unica segnalazione del reperimento di antracosi, come già segnalato in introduzione, è stata effettuata in Florida su tursiopi e globicefali spiaggiati: in questo caso l'indagine era prevalentemente qualitativa e ha dimostrato la presenza di polvere di carbone come costituente la pigmentazione nerastra in tessuto polmonare e linfonodale (Rawson *et al.*, 1995; Wilson *et al.*, 2007).

In generale, i rilievi necroscopici osservati sono tutti riferibili a quadri patologici spontanei, ad eccezione di un solo caso, di cui è presente la necroscopia completa (ID 122), che presenta lesioni da predazione umana sul rostro.

6. CONCLUSIONI

In conclusione, questa indagine ha confermato l'importanza del tessuto polmonare per comprendere molte informazioni sui cetacei spiaggiati, sia per quanto riguarda le cause dirette del decesso o dello spiaggiamento, sia per quanto concerne lo stato di salute dell'animale e dell'ambiente in cui vive. Abbiamo nuovamente sottolineato



l'entità del coinvolgimento polmonare nei quadri patologici degli cetacei a vita libera, soprattutto quando sostenuti da agenti parassitari. Si è potuto inoltre evidenziare una differenza specifica tra stenella e tursiope che merita ulteriori approfondimenti con indagini

necroscopiche più complete per comprenderla e studiarla in maniera più approfondita da un punto di vista eziologico. Si segnala, inoltre, la bassa incidenza di patologie polmonari negli animali mantenuti in ambiente controllato e, quindi, i tessuti provenienti da questi esemplari possono essere utilizzati per studi anatomici, fisiologici e fisiopatologici, dato l'ottimo stato di conservazione.

La valutazione dei patterns infiammatori ha messo in evidenza l'importanza della risposta macrofagica nelle sue tre componenti (alveolare, interstiziale e intra-vascolare) rispetto alle altre popolazioni infiammatorie. Sembra quindi che i cetacei tendano a proporre una risposta infiammatoria meno specifica e mirata, con il tentativo di localizzare il danno ed evitare la diffusione dell'agente patogeno.

I parassiti polmonari hanno dimostrato di non avere un ruolo diretto nel decesso ma determinano una riduzione delle difese aspecifiche che favorisce l'insorgenza di infezioni secondarie. Possono, quindi, avere un ruolo indiretto e predisponente lo spiaggiamento.

I risultati relativi al quadro parassitario e alla presenza di pigmento antracotico sembrano suggerire una maggior sofferenza delle popolazioni adriatiche rispetto a quelle tirreniche, anche se tali supposizioni devono essere considerate con cautela per la differente rappresentatività delle due specie nei due bacini. E' sicuramente necessario continuare il lavoro di confronto provando però a considerare una maggior eterogenicità di specie nei due bacini.

Si sottolinea inoltre che è necessario proporre un'adeguata formazione degli operatori che lavorano con queste specie per poter ottenere un numero maggiore di campioni di tessuto utili e significativi. Infatti, il conferimento dei tessuti alla BIT rispetto al numero degli spiaggiamenti segnalati risulta essere ancora basso e il grado di conservazione dei tessuti non soddisfacente riduce drasticamente la quantità di campioni utili per indagini scientifiche rendendo quindi lo sforzo dei volontari vano. Infine, la formazione dovrebbe essere diretta anche ad informare dei possibili rischi connessi con il lavoro su tali animali e delle precauzioni da utilizzare per evitare la possibile trasmissione di agenti zoonosici.

APPENDICE I - COLORAZIONI ISTOCHEMICHE

COLORAZIONE DI GRAM:

Reagenti:

- Crystal violetto
- Soluzione di Lugol
- Soluzione di alcool:acetone, 4:1
- Safranina

Preparazione:

1. Sparaffinare e idratare le soluzioni con acqua distillata
2. Coprirle completamente con la soluzione crystal violetto per un minuto
3. Risciacquare velocemente con la soluzione di Lugol
4. Coprirle con la soluzione di Lugol per un minuto
5. Risciacquarle in acqua distillata per circa 5 secondi
6. Decolorare facendo gocciolare; a soluzione alcool-acetone 4:1 sul vetrino fino ad eliminare l'eccesso di colorante
7. Risciacquare in acqua distillata per 5 secondi
8. Velocemente coprire le sezioni con la soluzione di safranina prima che possano seccarsi, per un minuto
9. Risciacquare in acqua distillata per 5 secondi
10. Asciugare i vetrini in stufa
11. Chiarificare in cilene
12. Montare il coprioggetto con un montante sintetico per preparati istologici (Eukitt; BIOPTICA s.p.a.)

COLORAZIONE DI GIEMSA

Reagenti:

- Ac. Citrico 2.4 ml
- Ac. Fosfato disodico 1.6 ml
- Soluzione di Giemsa (Merck) 10 ml
- Acqua distillata 50 ml

Preparazione:

1. Preparare una soluzione mescolando insieme i prodotti sopraindicati ed immergervi vetrini per 60 minuti
2. Decolorare in acetone per pochi secondi
3. Immergere nuovamente in una soluzione di acetone e cilene al 50%
4. Fare 2 passaggi in xilene
5. Montare con un montante sintetico per preparati istologici (Eukitt; BIOPTICA)

COLORAZIONE BLU DI PRUSSIA

Reagenti:

- Potassio esacianoferrato (II) 250 ml
- Acido cloridrico HCl 250 ml
- Soluzione rosso nucleare solido 2 x 250 ml

Preparazione:

1. Deparaffinare le sezioni di tessuto di 5-6 um e reidratare con la serie discendente di alcoli
2. Immergere i preparati in una soluzione al 2% potassio esacianoferrato e 2% acido cloridrico (HCl) in una cuvetta di Hellendahl (con estremità allargata) da 60 ml ed incubare per 20 min

3. Sciacquare accuratamente con acqua distillata
4. Immergere i preparati nel reagente soluzione rosso nucleare solido ed incubare per 5 min
5. Sciacquare con acqua distillata
6. Disidratare i preparati con la serie ascendente di alcoli e con xilene
7. Montare con montante sintetico per preparati istologici (Eukitt; BIOPTICA)
8. L'emosiderina risulterà blu, utilizzare un controllo positivo

COLORAZIONE SAFRANINA

Reagenti:

• Safranina O	25 g
• Etanolo 96%,	1 l, 2,5 l
• Soluzione cristal violetto per Gram	2,5 l
• Soluzione decolorante per Gram	2,5 l
• Soluzione di Lugol stab.	1 l
• Soluzione di Lugol	2,5 l

Preparazione:

1. Coprire i preparati con la soluzione cristal violetto e colorare per 1 min., quindi gettare via la soluzione in eccesso
2. Sciacquare accuratamente con la soluzione di Lugol stab
3. Coprire completamente con la soluzione di Lugol stab. per 1 min
4. Sciacquare accuratamente per 5 sec. con acqua distillata
5. Versare la soluzione decolorante per Gram sui preparati e agitare delicatamente, ventualmente in una cuvetta, fino a quando non vi siano più tracce di colore e i preparati appaiano di colore grigio-blu

6. Sciacquare accuratamente per 5 sec. con acqua distillata
7. Coprire completamente con la soluzione di safranina per Gram per 1 min
8. Sciacquare accuratamente per 5 sec. con acqua distillata
9. Far asciugare

COLORAZIONE PAS

Reagenti:

- Acido periodico 0,5%, acquoso 500 ml
- Reattivo di Schiff 500 ml

Preparazione:

1. Soluzione Blu alcian 1%
2. Sciogliere, miscelando, 5 g di blu alcian in 500 ml di acido acetico al 3%. Il valore pH è pari a circa 2,5
3. Soluzione di acido acetico al 3%
4. Miscelare con cautela 485 ml di acqua distillata con 15 ml di acido acetico 100%
5. Sparaffinare e portare le sezioni all'acqua come di consueto
6. Sciacquare con acqua distillata
7. Immergere in acido periodico per 5 min
8. Lasciare sotto l'acqua di rubinetto corrente per 3 min
9. Sciacquare con acqua distillata
10. Immergere in reattivo di Schiff per 15 min
11. Lasciare sotto l'acqua di rubinetto corrente per 3 min
12. Sciacquare con acqua distillata
13. Immergere in soluzione di ematossilina modificata secondo Gill III per 2 min

14. Lasciare sotto l'acqua di rubinetto corrente 3 min
15. Serie ascendente di alcoli, 2 volte con xilene
16. Montare con montante sintetico per preparati istologici (Eukitt; BIOPTICA)

COLORAZIONE TRICROMICA

Reagenti:

- Soluzione A – ematossilina ferrica di Weigert 18 ml
- Soluzione B – ematossilina ferrica di Weigert 18 ml
- Sol. Alcolica ac. picrico 30 ml
- Fucsina acida Ponceau secondo Mallory 30 ml
- Sol. Ac. fosfomolibdico 30 ml
- Anilina blu di Masson 30 ml

Preparazione:

1. Sparaffinare e portare le sezioni all'acqua come di consueto
2. Sciacquare con acqua distillata per 1 min
3. Mettere sulle sezioni 6 gocce di sol. A e poi 6 gocce di sol. B: lasciare agire per 10 min
4. Senza sciacquare, lasciare asciugare le sezioni ed aggiungere 10 gocce di sol. Alcolica di acido picrico: lasciare agire per 4 minuti
5. Risciacquare in acqua distillata e mettere 10 gocce di fucsina acida: lasciare agire per 4 minuti
6. Risciacquare in acqua distillata e mettere 10 gocce di sol. di acido fosfomolibdico: lasciare agire per 10 minuti
7. Senza sciacquare, lasciare asciugare i vetrini e aggiungere 10 gocce di Anilina Blu: lasciare agire per 5 minuti
8. Lavare in acqua distillata e disidratare nella scala ascendente degli alcoli, lasciando per 1 minuto in alcol assoluto

9. Pulire in xilene e montare con Eukitt

COLORAZIONE Grocott-Koski

Utilizzare una sezione di controllo.

Reagenti:

- Acqua ossigenata
- Ac. Cromico al 5%
- Metabisolfito di sodio al 1%
- Soluzione argentica
- Cloruro d'oro allo 0,2 %
- Tiosolfato di sodio – 5%
- Light green 0,2%
- Alcol
- Xilene

Preparazione:

1. Sparaffinare e portare le sezioni all'acqua come di consueto
2. Immergere il vetrino in ac. Cromico al 5% per 1 ora. Preparare la soluzione argentica
3. Risciacquare sotto l'acqua corrente
4. Decolorare in sodio metabisolfito all'1% per 1 minuto
5. Risciacquare sotto l'acqua corrente e successivamente più volte in acqua distillata
6. Immergere in soluzione argentica in una coplin che deve permanere per 10 minuti ad una temperatura di 56°C
7. Controllare al microscopio dopo aver risciaquato tutti i vetrini con acqua distillata.

Un controllo positive dovrebbe manifestarsi con una colorazione marrone scura

sulle ife dei funghi contro uno sfondo più chiaro o pulito. Se sottoesposto ricolorare per 2 minuti e controllare nuovamente dopo aver risciacquato. Continuare per un ora al massimo. (se ci mette molto tempo è probabile che la soluzione sia esausta.)

15 minuti sono di solito sufficienti

8. Colorare in cloruro d'oro al 0,2% (tetra clorurato di sodio) - 2 minuti
9. Sciacquare in acqua distillata
10. Fissare in tiosolfato di sodio al 5% - 5 minuti.
11. Lavare in acqua corrente
12. Contrastare con light green allo 0,2% in acido acetico 0,2% - 1 minuto
13. Disidratare i preparati con la serie ascendente di alcoli e con xilene
14. Montare con montante sintetico per preparati istologici (Eukitt; BIOPTICA)

COLORAZIONE PIGMENTI BILIARI

Utilizzare una sezione di controllo positiva.

Reagenti:

- Ac. Tricloroacetico al 25 25ml
- Cloruro di ferro al 10% 25ml

Preparazione:

1. Sparaffinare e portare le sezioni all'acqua come di consueto
2. Risciacquare in acqua distillata
3. Immergere la sezione nel reagente di Fouchet per 5 minuti
4. Risciacquare in acqua distillata

5. Contrastare immergendo la sezione nel reattivo di van Gieson per 2 minuti
6. Risciacquare rapidamente in acqua distillata
7. Asciugare il vetrino
8. Risciacquare rapidamente in alcol
9. Pulire in xilene e montare con Eukitt

IMMUNOISTOCHEMICA

L'immunoistochimica (IHC) è una tecnica utilizzata allo scopo di evidenziare la presenza di un antigene in una sezione di tessuto, utilizzando il legame specifico che si forma con l'anticorpo (proteina con struttura quaternaria che si lega in modo specifico all'epitopo dell'antigene) ed andando a verificare se, e dove, si è formato il complesso antigene-anticorpo.

Per eseguire una IHC si può utilizzare una metodica automatizzata che prevede una serie di step comuni qualsiasi sia l'anticorpo utilizzato.

Prima di procedere con la metodica automatizzata, il tessuto del campione da analizzare è stato fissato, processato, incluso in paraffina, tagliato e posto su un vetrino a carica elettrostatica. Tutti i vetrini sono stati messi in stufa a 37°C. La metodica automatizzata prevede l'impiego dell'immunocoloratore automatico BenchMark® Ventana Medical System, che permette di effettuare l'INDAGINE per un massimo di 20 vetrini per volta. La macchina lavora alla temperatura di 40 °C, e, pertanto, le incubazioni effettuate con gli anticorpi primari oscillano in poche decine di minuti. In aggiunta, il sistema di rivelazione utilizzato dall'immunocoloratore automatico è l'ultraView™ Universal DAB, un nuovo sistema di rivelazione biotina-free basato sull'utilizzo di un multimeri complessato all'enzima perossidasi Horse-raddish che permette di identificare in modo sensibile gli anticorpi primari di topo e coniglio. Questo kit comprende cinque componenti: ultraView™ Universal DAB Inhibitor (impedisce un'aspecifica perossidazione della DAB), ultraView™ Universal DAB HRP Multimer (multimeri biotina free complessato con la perossidasi Horse-raddish), ultraView™ Universal DAB Chromogen (diaminobenzidina), ultraView™

Universal DAB H₂O₂ (perossido di idrogeno che attiva l'azione della perossidasi che agisce sulla diaminobenzidina, la quale funge da substrato e determina la formazione di un prodotto finale marrone insolubile in alcool) e ultraView™ Universal DAB Copper. Tutti i passaggi sono effettuati in associazione alla presenza di una soluzione oleosa che ricopre il vetrino creando una camera umida e i reagenti sono dispensati automaticamente o manualmente (anticorpi primari, per controllo/variazione delle diluizioni). I reagenti sono continuamente miscelati e mantenuti al di sotto della copertura oleosa da flussi di aria orientati su ogni postazione. Al termine della corsa i vetrini sono lavati accuratamente con acqua corrente e sapone per asportare la soluzione oleosa, poi vengono disidratati in una scala ascendente di alcoli e montati.

In questo lavoro la tecnica IHC è stata utilizzata per evidenziare e quantificare la presenza di squame cheratiniche, che esprimono gli antigeni CK, all'interno degli spazi respiratori terminali (bronchioli e alveoli). Di seguito viene riportato il protocollo specifico per questo antigene:

- Sparaffinatura
- Smascheramento: Cell Conditioning per 30 min
- Titolazione con anticorpo: incubazione con anticorpo primario per 16 min
- Sistema di rivelazione: UltraView Universal DAB
- Ultra Wash (particolare lavaggio per eliminare il fondo dal vetrino)
- Controcolorazione con Ematossilina per 2 min

Per gli antigeni si sono anche effettuati dei controlli negativi omettendo l'anticorpo primario, sostituito con 100µl del diluente utilizzato per gli anticorpi stessi (Antibody Diluent), al fine di escludere la presenza di falsi positivi dovuti alla metodica.

BIBLIOGRAFIA

1. BARRETT T., BLIXENKRONE-MOLLER M., DI GUARDO G., DOMINGO M., DUIGNAN P., HALL A., MAMAEV L., OSTERHAUS A.D.M.E., 1995. Morbilliviruses in aquatic mammals: report on round table discussion. *Veterinary Microbiol*, 44 (2-4): 261-265.
2. BAYLIS H. A., DAUBNEY R., 1925. A revision of the lungworms of Cetacea. *Parasitology*, 17: 201-216.
3. BEINEKE A., SIEBERT U., WOHLSEIN P., BAUMGÄRTNER W., 2009. Immunology of whales and dolphins. *Vet Immunol Immunopathol*, article in press.
4. BETZ P., NERLICH A., PENNING R., EISENMENGER W., 1993. Alveolar macrophages and the diagnosis of drowning. *Forensic Sci Int*, 62(3): 217-24.
5. BLANCHAR T. V., SANTIAGO N. T., LIPSCOMB T. P., GARBER R. L., MCFEE W. E., KNOWLESS S., 2001. Two novel alphaherpesvirus associated with fatal disseminated infection in atlantic bottlenose dolphins. *J Wildl Dis*, 37: 297-305.
6. BLANCO C., SALOMÒN O., RAGA J. A., 2001. Diet of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) in the western Mediterranean Sea. *J. Mar. Biol. Ass*, 81: 1053–1058.
7. BLOCK G.A., HULBERT-SHEARON T.E., 1998. Association of serum phosphorus and calcium X phosphate product with mortality risk in chronic hemodialysis patients: a national study. *Am J Kidney Dis*, 31: 607-617.
8. BLOIS S.L., CARON I., MITCHELL C., 2009. Diagnosis and outcome of a dog with iatrogenic hyperadrenocorticism and secondary pulmonary mineralization. *Can Vet J*, 50(4): 397-400.
9. BORTOLOTTA A., CASINI L., STANZANI L.A., 1992. Dolphin mortality along the southern Italian coast (June-September 1991). *Aquatic Mammals*, 18: 56-60.

10. BOSHER D.P., 1974. Proceedings: Structural features in the lung of the Weddell seal, *Leptonychotes weddelli*, which facilitate deep diving: a light and electron microscope study. *J Anat*, 118(Pt 2): 400.
11. BOSTROM B.L., FAHLMAN A., JONES D.R., 2008. Tracheal compression delays alveolar collapse during deep diving in marine mammals. *Respir Physiol Neurobiol*, 161(3): 298-305.
12. BOWATER R.O., NORTON J., JOHNSON S., HILL B., O'DONOGHUE P., PRIOR H., 2003. H.Toxoplasmosis in Indo-Pacific humpbacked dolphins (*Sousa chinensis*) from Queensland. *Australian Veterinary Journal*, 81(10): 627-632.
13. BOYD R.B., 1975. A gross and microscopic study of the respiratory anatomy of the Antarctic Weddell seal, *Leptonychotes weddelli*. *J Morphol*, 147(3): 309-36.
14. BRAIN J.D., MOLINA R.M., DECAMP M.M., WARNER A.E., 1999. Pulmonary intravascular macrophages: their contribution to the mononuclear phagocyte system in 13 species. *Am J Physiol* 276: 146–154.
15. BRINKMANN B., FECHNER G., PÜSCHEL K., 1983. Lung histology in experimental drowning. *Z Rechtsmed*, 89(4): 267-77.
16. BRYDEN M.M., 1986. *Research on Dolphin*. Oxford/Clarendon Press, Harrison R. Eds.
17. BUCK J.D., SPOTTE S., 1986. Microbiology of captive white-beaked dolphins (*Lagenorhynchus albi-rostris*) with comments on epizootic. *Zoo Biology*, 5(4): 321-329.
18. BUCK J.D., WELLS R.S., RHINEHART H.L., HANSEN L.J., 2006. Aerobic microorganisms associated with free-ranging bottlenose dolphins in coastal Gulf of Mexico and Atlantic Ocean waters. *Wildl Dis*, 43(3): 536-544.
19. CABEZÓN O., RESENDES A.R., DOMINGO M., RAGA J.A., AGUSTÍ C., ALEGRE

- F., MONS J.L., DUBEY J.P., ALMERÍA S., 2004. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in wild dolphins from the Spanish Mediterranean coast. *J Parasitol*, 90(3): 643-4.
20. CAGNOLARO L., DI NATALE A., NOTARBARTOLO DI SCIARA G., 1983. Cetacei. Guide per il riconoscimento delle specie animali delle acque lagunari e costiere italiane. Consiglio Nazionale delle Ricerche, 184 pp.
 21. CALDWELL M. C., CALDWELL D. K., 1968. Occurrence of the lungworm (*Halocercus* sp.) in Atlantic bottlenosed dolphin (*Tursiops truncatus*) as a husbandry problem. In Proceedings of the second symposium in disease and husbandry of aquatic mammals, D. K. and M. C. Caldwell (eds.), Marineland Research.
 22. CANESTRI TROTTI G., FIORAVANTI M. L., CAPPELLARO H., CORRADINI L., (1990). Reperti elmintologici in cetacei piaggiati in Adriatico. *Parassitologia*, 32 (suppl. 1): 44-45.
 23. CATES M.B., KAUFMAN L., GRABAU J.H., PLETCHER J.M., SCHROEDER J.P., 1986. Blastomycosis in an Atlantic bottlenose dolphin. *J Am Vet Med Assoc.*, 189(9): 1148-50.
 24. CHEN Z.T., LI S.L., CAI E.Q., WU W.L., JIN J.S., ZHU B., 2003. LPS induces pulmonary intravascular macrophages producing inflammatory mediators via activating NF- κ B. *J Cell Biochem* 89: 1206–1214.
 25. CLAUSEN B., ANDERSEN S., 1988. Evaluation of bycatch and health status of the harbour porpoise (*Phocoena phocoena*) in Danish waters. *Dan. Rev. Game Biol*, 13: 1–20.
 26. CONLOGUE G. J., OGDEN J. A., FOREYT W. J., 1985. Parasites of the Dall's porpoise (*Phocoenoides dalli* True). *Journal of Wildlife Diseases*, 21: 160-166.
 27. CONRAD P.A., MILLER M.A., KREUDER C., JAMES E.R., MAZET J., DABRITZ

- H., JESSUP D.A., GULLAND F., GRIGG M.E., 2005. Transmission of *Toxoplasma*: clues from the study of sea otters as sentinels of *Toxoplasma gondii* flow into the marine environment. *Int J Parasitol*, 35(11-12): 1155-68.
28. CORNAGLIA E., REBORA L., GILI, C., DI GUARDO G., 2000. Histopathological and immunohistochemical studies on cetaceans found stranded on the coast of Italy between 1990 and 1997. *J. Vet. Med. Ser. A*, 47: 129–142.
29. COWAN D.F., SMITH T.L., 1999. Morphology of the lymphoid organs of the bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus*. *J Anat*, 194(4): 505-17.
30. COZZI B., BAGNOLI P., ACOCELLA F., COSTANTINO M.L., 2005. Structure and biomechanical properties of the trachea of the striped dolphin *Stenella coeruleoalba*: Evidence for evolutionary adaptations to diving. *Anat Rec* 284:500–510.
31. DAILEY M.D., 2001. Parasitic Diseases. In: *CRC Handbook of Marine Mammal Medicine*. Second Edition. Edited by Leslie A. Written by Dierauf and Frances M. D. Gulland. CRC Press. Pag 357-379.
32. DAWSON C.E., PERRETT L.L., STUBBERFIELD E.J., STACK J.A., FARRELLY S.S., COOLEY W.A., DAVISON N.J., QUINNEY S., 2008. Isolation and characterization of *Brucella* from the lungworms of a harbor porpoise (*Phocoena phocoena*). *J Wildl Dis.*,44(2): 237-46.
33. DAWSON C.E., STUBBERFIELD E.J., PERRETT L.L., KING A.C., WHATMORE A.M., BASHIRUDDIN J.B., STACK J.A., MACMILLAN A.P., 2008. Phenotypic and molecular characterisation of *Brucella* isolates from marine mammals. *BMC Microbiol*, 8: 224.
34. DE GUISE S., LAGACÉ A., GIRARD C., BÉLAND P., 1993. Intramuscular *Sarcocystis* in two beluga whales and an Atlantic white-sided dolphin from the St. Lawrence estuary, Quebec, Canada. *J Vet Diagn Invest* 5:296-300 (1993).

35. DECAMP M.M., WARNER A.E., MOLINA R.M., BRAIN J.D., 1992. Hepatic versus pulmonary uptake of particles injected into the portal circulation in sheep. *Am Rev Respir Dis* 146: 224–231.
36. DEGOLLADA E., DOMINGO M., ALONSO J.M., ALEGRE F., TELLO M., LOPEZ A., DOMINGUEZ L., 1996. Nocardiosis in a striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*). In Proceedings of the third ECS workshop on Cetacean Pathology: Lung Pathology, ECS Newsletter n.37 – Special Issue, (Ed. da Hartmann M.G.), 16-18.
37. DELYAMURE S.L., 1955. Helminthofauna of Marine Mammals (Ecology and Phylogeny) -in Russian. Skrjabin K.I. (Ed.), Izdatel'stvo Akademii Nauk SSR, Moscow, Translated by Israel Program for Scientific Translations, Jerusalem, 1968.
38. DI GUARDO G., CASTAGNARO M., MARRUCHELLA G., MAZZARIOL S., MIGNONE W., OLIVIERI V., PONZIO P., COZZI B., 2005. Human-Induced Mortality in Cetaceans Found Stranded on the Italian Coastline (1995-2005).
39. DI GUARDO G., MARRUCHELLA G., AGRIMI U., KENNEDY S., 2005. Morbillivirus infections in aquatic mammals: a brief overview. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*, 52 (2): 88-93.
40. DOMINGO M., VILAFRANCA M., VISA J., PRATS N., TRUDGETT A., VISSER I., 1995. Evidence for chronic morbillivirus infection in the Mediterranean striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*). *Vet Microbiol*, 44(2-4): 229-39.
41. DOMINGO M., VISA J., PUMAROLA M., MARCO A. J., FERRER L., RABANAL R., KENNEDY S., 1992. Pathologic and immunocytochemical studies of morbillivirus infection in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*). *Vet Pathol*, 29(1): 1-10.
42. DUBEY J.P., FAIR P.A., SUNDAR N., VELMURUGAN G., KWOK O.C., MCFEE W.E., MAJUMDAR D., SU C., 2008. Isolation of *Toxoplasma gondii* from bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *J Parasitol*, 94(4):821-3.

43. DUBEY J.P., MERGL J., GEHRING E., SUNDAR N., VELMURUGAN G.V., KWOK O.C., GRIGG M.E., SU C., MARTINEAU D., 2009. Toxoplasmosis In Captive Dolphins (*Tursiops truncatus*) and Walrus (*Odobenus rosmarus*). *J Parasitol*, 95(1): 82-5.
44. DUIGNAN P. J., GERACI J. R., RAGA A. J., CALZADA N., 1992. Pathology of morbillivirus infection in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) from Valencia and Murcia, Spain. *Can J Vet Res*, 56(3): 242-248.
45. DUIGNAN PJ, HOUSE C, GERACI JR, DUFFY N, RIMA BK, WALSH MT, EARLY G, ST AUBIN DJ, SADOVE S, KOOPMAN H, ET AL., 1995. Morbillivirus infection in cetaceans of the western Atlantic. *Vet Microbiol.*, 44(2-4): 241-9.
46. ESPERÓN F., FERNÁNDEZA, SÁNCHEZ-VIZCAÍNO J.M., 2008. Herpes simplex-like infection in a bottlenose dolphin stranded in the Canary Islands. *Dis Aquat Organ*, 81(1): 73-6.
47. ESTEPA J.C., AGUILERA-TEJERO E., ZAFRA R., MAYER-VALOR R., RODRÍGUEZ M., PEREZ J., 2006. An unusual case of generalized soft-tissue mineralization in a suckling foal. *Vet Pathol*, 43(1): 64-7.
48. EVANS K., THRESHER R., WAMEKE R. M., BRADSHAW C. J.A., POOK M., THIELE D., HINDELL M. A., 2005. Periodic variability in cetacean strandings: links to large scale climate events. *Biol. Lett.*, 1(2): 147–150.
49. EWALT D.R., PAYEUR J.B., MARTIN B.M., CUMMINS D.R., MILLER W.G., 1994. Characteristics of a *Brucella* species from a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *J Vet Diagn Invest.*, (4): 448-52.
50. FAHLMAN, A., OLSZOWKA, A., BOSTROM, B. AND JONES, D. R. (2006). Deep diving mammals: dive behavior and circulatory adjustments contribute to bends avoidance. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 153, 66-77.

51. FANNING J.C., HARRISON R.J., 1974. The structure of the trachea and lungs of the South Australian bottle-nose dolphin. In: Harrison RJ, editor. Functional anatomy of marine mammals, vol. 2. London: Academic Press. p 231–252.
52. FAULKNER J., MEASURES L.N., WHORIKEY F.G., 1997. *Stenurus minor* (Metastrongyloidea: Pseudaliidae) infections of the cranial sinuses of the harbour porpoise, *Phocoena phocoena*. *Can J Zool* 76: 1209–1216.
53. FOGNANI P., 2005. Parasites in cetaceans from the NW Mediterranean with particular reference to ecology and pathology of *Pholeter gastrophilus* (Kossack, 1910). Tesi di dottorato, Università degli Studi di Padova, Italia.
54. FOSTER G., ROSS H.M., PATTERSON I.A.P., HUTSON R.A., COLLINS M.D., 1998. *Actinobacillus scotiae* sp. nov., a new member of the family Pasteurellaceae Pohl (1979) 1981 isolated from porpoise (*Phocoena phocoena*). *Journal Int J Syst Bacteriol* 48: 929-933.
55. FRATI R., FORLETTA R., G. TERRACCIANO G., DI GUARDO G., AGRIMI U., MARCON S., KENNEDY S., 1996. Parassitosi nei mammiferi acquatici con particolare riferimento ai cetacei. Parasitic diseases in sea mammals with special reference to cetaceans, 17(1): 79-88.
56. GACA J.G., PALESTRANT D., LUKES D.J., OLAUSSON M., PARKER W., DAVIS R.D., 2003. Prevention of acute lung injury in swine: depletion of pulmonary intravascular macrophages using liposomal clodronate. *J Surg Res* 112: 19–25.
57. GERACI J.R E ST. AUBIN D.J , 1987, Effects of parasites on marine mammals, *Int J. Parasitol.*, 17 407-414.
58. GERACI J.R., LOUNSBURY V.J., 1993. *Marine Mammals Ashore*, Texas A&M Sea Grant Publication, par. 1.2, 6.2, 6.3, 7.1, 7.2, 7.3.
59. GILKA F., SUGDEN E.A., 1984. Ectopic mineralization and nutritional

- hyperparathyroidism in boars. *Can J Comp Med*, 48(1): 102-7.
60. GILL SS, SURI SS, JANARDHAN KS, CALDWELL S, DUKE T, SINGH B. Role of pulmonary intravascular macrophages in endotoxin-induced lung inflammation and mortality in a rat model. *Respir Res*. 2008 Oct 24;9:69.
 61. GODINHO A., JEPSON P., DEVILLE R., CASTRO P., JABER J., FERNÁNDEZ, A., 2006. Intracytoplasmic eosinophilic globules in hepatocytes of by-caught harbour porpoises (*Phocoena phocoena*). Poster Presentation at the 20th Annual Meeting of the European Cetacean Society. Gdynia, Poland.
 62. GULLAND F. M., LOWENSTINE L. J., SPRAKER T. R. 2001. Noninfectious Diseases. In: *CRC Handbook of Marine Mammal Medicine*. Second Edition. Edited by Leslie A. Written by Dierauf and Frances M. D. Gulland. CRC Press. Pp 521-547.
 63. HARMS A. C., MAGGI R. G., BREITSCHWERDT E. B., CLEMONS-CHEVIS C. L., SOLANGI M., ROTSTEIN D. S., FAIR P. A., HANSEN L. J., HOHN A. A., LOVEWELL G. N., MCLELLAN W. A., PABST D. A., ROWLES T. K., SCHWACKE L. H., FORREST I. TOWNSEND F. I., RANDALL S. WELLS R. S., 2008. *Bartonella* species detection in captive, stranded and free-ranging cetaceans. *Vet. Res*, 39: 59.
 64. HERNÁNDEZ-MORA G., CHARLES A. MANIRE, GONZÁLEZ-BARRIENTOS R., BARQUERO-CALVO E., GUZMÁN-VERRI C., STAGGS L., THOMPSON R., CHAVES-OLARTE E., MORENO E., 2009. Serological Diagnosis of *Brucella* Infections in *Odontocetes*. *Clinical and Vaccine Immunology*, 16(6) p. 906-915.
 65. HIGGINS R., 2000. Bacteria and fungi of marine mammals. *Can Vet J*, 41(2): 105–116.
 66. HINSHAW V.S., BEAN W.J., GERACI J., FIORELLI P., EARLY G., WEBSTER R.G., 1986. Characterization of two influenza A viruses from a pilot whale. *J Virol*,

- 58(2): 655–656.
67. HOWARD E.B., BRITT J. O. JR., MATSUMOTO G., 1983. Parasitic diseases. In: Edwin B. Howard (Editor), *Pathobiology of Marine Mammal Diseases*, CRC Press: Boca Raton, Fla, p. 119-232.
 68. HOWARD E.B., BRITT J.O., MATSUMOTO G.K., ITAHARA R., NAGANO C.N., 2000. Bacterial Disease, in: *Pathobiology of Marine Mammal Diseases* (Ed. da Howard E.B.), 1(4): 69-118, CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
 69. JENSEN E.D., LIPSCOMB T., VAN BONN B., MILLER G., FRADKIN J.M., RIDGWAY S.H., 1998. Disseminated histoplasmosis in an Atlantic bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *J Zoo Wildl Med*, 29(4):456-60.
 70. JEPSON P.D., BAKER J.R., KUIKEN T., SIMPSON V.R., KENNEDY S., BENNETT P.M., 2000. Pulmonary pathology of harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) stranded in England and Wales between 1990 and 1996. *Vet Rec.*, 146: 721-728.
 71. JEPSON, P. D., BENNETT, P. M., ALLCHIN, C. R., LAW, R. J., KUIKEN, T., BAKER, J. R., ROGAN, E. & KIRKWOOD, J. K. (1999) Investigating potential associations between chronic exposure to polychlorinated biphenyls and infectious disease mortality in harbour porpoises from England and Wales. *Science of the Total Environment* 244, 339-348.
 72. KAWASHIMA M., KUWAMURA M., TAKEYA M., YAMATE J., 2004. Morphologic Characteristics of Pulmonary Macrophages in Cetaceans: Particular Reference to Pulmonary Intravascular Macrophages as a Newly Identified Type. *Veterinary Patology*, 41: 682-686.
 73. KENNEDY S., 1998. Morbillivirus infections in aquatic mammals. *J Comp Pathol.*, 119(3): 201-25.
 74. KENNEDY S., STOSKOPF S. 2001. Viral Diseases. In: *CRC Handbook of Marine*

- Mammal Medicine. Second Edition. Edited by Leslie A. Written by Dierauf and Frances M. D. Gulland. CRC Press. Page 285-307.
75. KINOSHITA R., BROOK F., VEDROS N., WAD H.S., LUNG R., NG T., TAO L.Y., YUEN C.S., 1994. Staphylococcal isolation and clinical cases of *Staphylococcus aureus* in bottlenose dolphins at Ocean Park. Hong Kong , Proceeding of the 25th Annual Workshop of the International Association for Aquatic Animal Medicine, 159.
 76. KOBAYASHI T., WU H., CUI X., LI W., MATSUHISA D., TANAKI N., TASHIRO K.,
 77. Effects of Surfactant Replacement on Irregular Overdistension of Meconium-Injured Lungs in Rats. *Neonatology* 2008;93:117-124.
 78. KOOYMAN G. L., 1973. Respiratory Adaptations in Marine Mammals. Physiological Research Laboratory, Scripps Institution of Oceanography, *American Zoologist*, 13(2): 457-468.
 79. KOOYMAN G. L., PONGANIS P. J., 1998. The physiological basis of diving to depth: Birds and Mammals. *Annual Review of Physiology*, 60: 19-32.
 80. KUWAMURA M., SAWAMOTO O., YAMATE J., AOKI M., OHNISHI Y., KOTANI T., 2007. Pulmonary Vascular Proliferation and Lungworm (*Stenurus ovatus*) in a Bottlenose Dolphin (*Tursiops truncatus*). *J. Vet. Med. Sci.*, 69(5): 531-533.
 81. LANDY R.B., 1980. A review of neoplasia in marine mammals. The comparative Pathology of Zoo Animals, Eds. Montali R. and Migaki G.
 82. LAWRENCE DUNN J., BUCK J. D., ROBECK T. R. 2001. Bacterial Diseases of Cetaceans and Pinnipeds. In: *CRC Handbook of Marine Mammal Medicine. Second Edition.* Edited by Leslie A. Written by Dierauf and Frances M. D. Gulland. CRC Press. pp 309-335.
 83. LEHNERT K., RAGA J. A., SIEBERT U., 2005. Macroparasites in stranded and

- bycaught harbour porpoises from German and Norwegian waters. *Dis Aquat.* 64: 265–269.
84. LINDSAY D. S., COLLINS M. V., MITCHELL S. M., COLE R. A., FLICK G. J., WETCH C. N., LINDQUIST A., DUBEY J. P., 2003. Sporulation and survival of *Toxoplasma gondii* oocysts in seawater. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 50/ (Suppl.): S687–S688.
 85. LOCALI R.F., ALMEIDA. M., OLIVEIRA-JÚNIOR I.S., 2006. Use of the histopathology in the differential diagnosis of drowning in fresh and salty water: an experimental model establishment in rats. *Acta Cir Bras*, 21(4): 203-6.
 86. LOPEZ A., 2007. Respiratory System. In: *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. IV edition Written by Mdonald G., Zachary J. D. Edited by Mosby Elsevier. Cap 9: 463-558.
 87. LORIN DE LA GRANDMAISON G, PARAIRE F., 2003. Place of pathology in the forensic diagnosis of drowning. *Ann Pathol.* 23(5): 400-7.
 88. MACCHIONI G., BARDUCCI S., 1989. Parasitological observations in the dolphin (*Tursiops Truncatus*). *Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria di Pisa (Italy)*, 42: 137-143.
 89. MACLEOD C.D., REIDENBERG J.S., WELLER M., SANTOS M.B., HERMAN J., GOOLD J., PIERCE G.J., 2007. Breaking Symmetry: The Marine Environment, Prey Size, and the Evolution of Asymmetry in Cetacean Skulls. *Anatomical Record*.
 90. MACLEOD C.D., REIDENBERG J.S., WELLER M., SANTOS M.B., HERMAN J., GOOLD J., PIERCE G.J., 2007. Breaking Symmetry: The Marine Environment, Prey Size, and the Evolution of Asymmetry in Cetacean Skulls. *J Anat* 290(6): 539-545.
 91. MANFREDI M. T., VENEZIANI I., GRIPPA G., MIGNONE W., PLATTO S., 2005. Infestazioni parassitarie dei Cetacei spiaggiati. *O&DV*, 7-8: 37-45.

92. MAZZARIOL S., 2002. Indagine sulle Patologie Spontanee di Delfinidi e Zifidi, sia in Libertà che in Ambiente Controllato. Tesi di Laurea, Facoltà di Medicina Veterinaria. Università degli Studi di Padova.
93. MAZZARIOL S., MARRUCHELLA G., DI GUARDO G., PODESTA' M., OLIVIERI V., COLANGELO P., KENNEDY S., CASTAGNARO M., COZZI B. Post-mortem Findings in Cetacean Stranded along Italian Adriatic Sea coastline (2000-2007).
94. MEASURES L.W., 2001. Lungworm of marine mammals. In : W.M. Samuel, MJ Pybus, AA Kocan (eds), Parasitic Diseases of Wild Animals, Second Edition. Iowa state University Press, Ames: Cap. 10: 279-300.
95. MEDWAY W., SCHRYVER H.F., 1973. Respiratory problems in captive small cetaceans, J. Am. Vet. Med. Assoc., 163(6): 571-3.
96. MIKAELIAN I, BOISCLAIR J, DUBEY JP, KENNEDY S, MARTINEAU D. Toxoplasmosis in beluga whales (*Delphinapterus leucas*) from the St Lawrence estuary: two case reports and a serological survey. J Comp Pathol. 2000 Jan; 122(1): 73-76.
97. MILLER W.G., PADHYE A.A., VAN BONN W., JENSEN E., BRANDT M.E., RIDGWAY S. H., 2002. Cryptococcosis in a bottlenose dolphin (*tursiops truncatus*) caused by *cryptococcus neoformans* var. *gattii*. J Clin Microbiol, 40(2): 721-724.
98. MORIMITSU T., NAGAI T., IDE M., KAWANO H., NAICHUU A., KOONO M., ISHII A., 1987. Mass stranding of Odontoceti caused by parasitogenic eighth cranial neuropathy. J Wildl Dis. (4): 586-90.
99. MOUTON M., REEB D., BOTHA A., BEST P., 2009. Yeast infection in a beached southern right whale (*Eubalaena australis*) neonate. J Wildl Dis, 45(3): 692-9.
100. NAKAKUKI S., 1994. The bronchial tree and lobular division of the lung in the

- striped dolphin (*Stenella coeruleo-albus*). *J Vet Med Sci*, 56(6): 1209-11.
101. NIELSEN O., SMITH G., WEINGARTL H., LAIR S., MEASURES L., 2008. Use of a slam transfected vero cell line to isolate and characterize marine mammal morbilliviruses using an experimental ferret model. *J Wildl Dis.* 44(3): 600-11.
102. NOTARBARTOLO DI SCIARAG., DEMMA M., 2004. Guida dei mammiferi marini del Mediterraneo. Terza edizione aggiornata, Ed. Franco Muzzio, Padova, pp 51-60, 129-137, 138-145.
103. O'HARA T.M., O'SHEA T.J. 2001. Viral Diseases. In: *CRC Handbook of Marine Mammal Medicine. Second Edition.* Edited by Leslie A. Written by Dierauf and Frances M. D. Gulland. CRC Press. Pagine 471-502.
104. OSTERHAUS A.D., BROEDERS H.W., TEPPEMA J.S., KUIKEN T., HOUSE J.A., VOS H.W., VISSER I.K., 1993. Isolation of a virus with rhabdovirus morphology from a white-beaked dolphin (*Lagenorhynchus albirostris*). *Arch Virol.*, 133(1-2): 189-93.
105. PABST D.A., ROMMEL SA., MC LELLAN WA., 1999. Functional morphology of marine mammals. *Biology of marine mammals.* Reynolds JE and Rommel SA (Eds), Smithsonian Institution Press, Washington, D.C., pp 15-72.
106. PAMPIGLIONE S., CANESTRI TROTTI G., 1990. In guida allo studio della Parassitologia. Seconda edizione, società editrice Esculapio, pp 27.
107. PERRIN W. F., WILSON C. E., ARCHER F. I., 1994. Striped dolphin *Stenella coeruleoalba* (Meyen, 1833). In "Handbook of Marine Mammals". Ridgway S.H., Harrison R. (eds). Academic Press, San Diego. Vol. 5, pp. 129 – 160.
108. PERRIN W. F., WÜRSIG. B., THEWISSEN J. G. M., 2008. *Encyclopedia of Marine Mammals.* Editore & Imprint: Academic Press Inc Città: Oxford pp: 327-328.
109. PIETTE M.H., DE LETTER E.A., 2006. Drowning: still a difficult autopsy diagnosis.

- Forensic Sci Int.; 163(1-2): 1-9.
110. PODESTÀ M., COZZI B., 2004. Analysis of cetacean strandings along the Italian coastline in the years 1986-2004.
111. PÜSCHEL K., SCHULZ F., DARRMANN I., TSOKOS M., 1999, Macromorphology and histology of intramuscular hemorrhages in cases of drowning: *Int J Legal Med* (1999) 112 :101–106.
112. RAGA J. A., ABRIL E., ALMOR P., 1987. *Skrjabinalius guevarai* Gallego et Selva, 1979 (Nematoda: Pseudaliidae), a lungworm parasitizing dolphins (Cetacea: Delphinidae) in the Western Mediterranean Sea. *Rivista di Parassitologia*, vol. IV (XLVIII): 27-32.
113. RAGA J. A.; BANYARD A., DOMINGO M., CORTEYN M., VAN BRESSEM M. F., FERNÁNDEZ M., AZNAR F. J., BARRETT T., 2008. Dolphin morbillivirus epizootic resurgence, Mediterranean Sea. *Emerging infectious diseases*, 14(3): 471-3.
114. RAGA J.A., BALBUENA J.A., AZNAR J., FERNÁNDEZ M.. 1997. The impact of parasites on marine mammals: a review. *Parassitol*, 39(4): 293-6.
115. RANDALL S.W., SCOTT M.D., 2002. Bottlenose dolphins *Tursiops truncatus*. In “*Encyclopedia of Marine Mammals*”. Perrin W. F., Würsig B., Thewissen J. G. M. (eds). Academic press, pp. 122 – 128.
116. RAWSON AJ, BRADLEY JP, TEETSOV A, RICE SB, HALLER EM, PATTON GW., 1995. A role for airborne particulates in high mercury levels of some cetaceans. *Ecotoxicol Environ Saf*, 30(3): 309-14.
117. REIDARSON T. H., GRINER L. A., PAPPAGIANIS D., J MCBAIN, 1998. Coccidioidomycosis in a bottlenose dolphin. *J Wildl Dis*, 34(3): 629-631.
118. REIDARSON T. H., MC BAIN J. F., DALTON L. M. RINALDI M. G. 2001. *Micotic Diseases*. In: *CRC Handbook of Marine Mammal Medicine*. Second Edition. Edited

- by Leslie A. Written by Dierauf and Frances M. D. Gulland. CRC Press. Page 337-355.
119. REIDARSON T.H., HARRELL J.H., RINALDI M.G., MCBAIN J., 1998(a). Bronchoscopic and serologic diagnosis of *Aspergillus fumigatus* pulmonary infection in a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *J Zoo Wildl Med*, 29(4): 451-5.
 120. REIDENBERG J, LAITMAN JT., 1988. Existence of vocal folds in the larynx of Odontoceti (toothed whales). *Anat Rec* 221: 884–891.
 121. REIDENBERG J.S., LAITMAN J.T., 1987. Position of the larynx in odontoceti (toothed whales). *Anat Rec* 218: 98–106.
 122. REIDENBERG JS, LAITMAN JT, 1994. Anatomy of the hyoid apparatus in Odontoceti (toothed whales): specializations of their skeleton and musculature compared with those of terrestrial mammals. *Anat Rec.*, 240(4): 598-624.
 123. REIDENBERG JS, LAITMAN JT., 2008. Sisters of the sinuses: cetacean air sacs. *Anat Rec*, 291(11): 1389-1396.
 124. RESENDES A.R., ALMERÍA S., DUBEY J.P., OBÓN E., JUAN-SALLÉS C., DEGOLLADA E., ALEGRE F., CABEZÓN O., PONT S., DOMINGO M., 2002. Disseminated toxoplasmosis in a Mediterranean pregnant Risso's dolphin (*Grampus griseus*) with transplacental fetal infection. *J Parasitol*, 88(5): 1029-32.
 125. REYNOLDS H.Y., Lung inflammation and fibrosis: an alveolar macrophage-centered perspective from the 1970s to 1980s. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 Jan 15;171(2):98-102.
 126. RIDGWAY S.H., 1972. *Mammals of the sea. Biology and Medicine*. Charles C. Thomas, Springfield, Illinois, U.S.A. Cap. 6.
 127. ROMANO T.A., FELTEN S.Y., OLSCHOWKA J.A., FELTEN D.L., 1993. A microscopic investigation of the lymphoid organs of the beluga, *Delphinapterus*

- leucas. *Journal of Morphology* 215: 261-287.
128. ROMMEL S. A., LOWENSTINE L. J. 2001. Gross and Microscopic Anatomy. In: CRC Handbook of Marine Mammal Medicine. Second Edition. Edited by Leslie A. Written by Dierauf and Frances M. D. Gulland. CRC Press. pp 129-164.
129. RONALD K., MYERS E.T., M DONALD M., GAVIN M. C., 2007. Cellular and tissue responses to injury. In: Pathologic Basis of Veterinary Disease. IV edition Written by Mdonald G., Zachary J. D. Edited by Mosby Elsevier. Cap 1: 3-59.
130. ROSS H.M., JAHANS K.L., MACMILLAN A.P., REID R.J., THOMPSON P.M., FOSTER G., 1996. Brucella species infection in North Sea seal and cetacean population. *Vet. Rec.*, 138: 647-648.
131. SHIRAIISHI R., ITOU T., SUGISAWA H., SHOJI Y., ENDO T., SAKAI T., 2002. The respiratory burst activity of bottlenose dolphin neutrophils elicited by several stimulants. *Journal of veterinary medical science*, 64(8): 711-714.
132. SIEBERT U., WÜNSCHMANN A., WEISS R., FRANK H., BENKE H., FRESE K., 2001. Post-mortem findings in harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) from the German North and Baltic Seas. *J Comp Pathol* 124: 102–114.
133. SIMPSON J.G., GARDNER M.B., 1972. Comparative microscopic anatomy of selected marine mammals. In *Mammals of the Sea: Biology and Medicine* (ed. Ridgway SH). pp. 298-418. Springfield, Illinois : Charles C. Thomas.
134. SLIJPER E.J., 1979. Whales. translated by A.J. Pomerans 2nd English ed. / with a new foreword, concluding chapter and bibliography by Richard J. Harrison. London : Hutchinson.
135. SMITH T.L., TURNBULL B.S., COWAN D.F., 1999. Morphology of the complex laryngeal gland in the Atlantic bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus*. *Anat Record*, 254: 98-106.

136. SNIEZEK, J.H., COATS, D.W., SMALL, E.B., 1995. *Kyaroikeus cetarius* n.g., n. sp., a parasitic ciliate from the respiratory tract of odontocete cetacean, *J. Eukar. Micro.*, 42: 260-268.
137. ST LEGER J.A., BEGEMAN L., FLEETWOOD M., FRASCA S., GARNER M.M., LAIR S., TREMBLEY S., LINN M.J, TERIO K.A., 2009. Comparative pathology of nocardiosis in marine mammals. *Vet Pathol*, 46(2): 299-308.
138. SWART R.L., HARDER T.C., ROSS P.S., VOS H.W., OSTERHAUS A.D., 1995. Morbilliviruses and morbillivirus diseases of marine mammals. *Infect Agents Dis.* 4(3): 125-30.
139. SWEENEY J. C., REDDY M. L. 2001. Cetacea Cytology. In: *CRC Handbook of Marine Mammal Medicine. Second Edition.* Edited by Leslie A. Written by Dierauf and Frances M. D. Gulland. CRC Press. pp 437-448.
140. SWEENEY J.C., MIGAKI G., VAINIK P.M., CONKLIN R.H., 1976. Systemic mycoses in marine mammals. *J Am Vet Med Assoc*, 38(2): 177-191.
141. SWEENEY J.C., RIDGWAY S.H., 1975. Common diseases of small cetaceans. *J Am Vet Med Assoc* 167: 533–540.
142. TAUBENBERGER J. K., 2000. Molecular Genetic Evidence of a Novel Morbillivirus in a Long-Finned Pilot Whale (*Globicephalus melas*). *Emerg Infect Dis*, 6(1): 42-5.
143. TIPERMAN J., 1972. The diagnosis of drowning: a review. *Forensic Sci*, 1:397-409.
144. TRONCONE A., ZIZZO G., COLELLA A., PERILLO AND M.T. MANFREDI, 1994. Parasitoses of dolphins. Prevalence of parasitic infections in stranded dolphins. *Obiettivi e Documenti Veterinari* 15(12): 39-44.
145. URQUHART G. M., ARMOUR J., J.L. DUNCAN J. L., DUNN A. M., JENNINGS F. W., 1998. *Parassitologia veterinaria.* Ed. Utet.
146. VAALA W.E., 1999. Peripartum asphyxia syndrome in foals. *Proc 45th AAEP*:247–

147. VALDERRAMA VASQUEZ C.A., MACGREGOR S.K., ROWCLIFFE J.M., JEPSON P.D., 2008. Occurrence of a monophasic strain of Salmonella group B isolated from cetaceans in England and Wales between 1990 and 2002. *Environ Microb*, 10(9): 2462-8.
148. VAN BRESSEM M. F., VAN WAEREBEEK K., JEPSON D. P., RAGA J. A., DUGNAN P. J., NIELSEN O., DI BENEDITTO A. P., SICILIANO S., RAMOS R., KANT W., PEDDEMORS V., KINOSHITA R., ROSS P. S., LÓPEZ-FERNANDEZ A., EVANS K., CRESPO E., BARRETT T., 2001. An insight into the epidemiology of dolphin morbillivirus worldwide. *Veterinary Microbiology*, 4: 287-304.
149. VAN BRESSEM M.F., VAN WAEREBEEK K., RAGA J.A., 1999. A review of virus infections of cetaceans and the potential impact of morbilliviruses, poxviruses and papillomaviruses on host population dynamics. *Dis Aquat Organ*, 38(1):53-65.
150. VAN BRESSEM M.F., VAN WAEREBEEK K., RAGA J.A., GODFROID J., BREW S.D., MACMILLAN A.P. 2001. Serological evidence of Brucella species infection in odontocetes from the south Pacific and the Mediterranean. *Vet Rec*, 148(21): 657-61.
151. VAN ELK, C.E. VAN DEP BILDT, M.W.G., MARTINA, B.E.E., OSTERHAUS, A.D.M.E. AND KUIKEN, T., 2007. Escherichia coli septicaemia associated with lack of maternally acquired immunity in a bottlenose dolphin calf. *Vet Pathol*. 44, 88-92.
152. VISSER I.K., VAN BRESSEM M.F., BARRETT T., OSTERHAUS A.D., 1993. Morbillivirus infections in aquatic mammals. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*, 52(2): 88-93.
153. VUKOVIC S., LUCIĆ H., GOMERCIĆ H., DURAS GOMERCIĆ M., GOMERCIĆ T., SKRTIĆ D., CURKOVIĆ S., 2005. Morphology of the lymph nodes in bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) and striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) from the

- Adriatic Sea. *Acta Vet Hung.*, 53(1): 1-11.
154. WARNER AE, BARRY BE, BRAIN JD, 1986. Pulmonary intravascular macrophages in sheep. *Lab Invest* 55: 276–288.
 155. WESSELS JC, CHASE CC., 1998. Light and electron microscopical observations on the terminal airways and alveoli of the lung of the SA (Cape) fur seal *Arctocephalus pusillus*. *J Vet Res*, 65(4): 253-62.
 156. WILSON J.,W, WELLS R., AGUILAR A.,BORRELL A., TORNERO V., REIJNDERS P., MOORE M, STEGEMAN J.J., 2007, Correlates of Cytochrome P450 1A1 Expression in Bottlenose Dolphin (*Tursiops truncatus*) Integument Biopsies, *Toxicological Sciences* 97(1), 111–119.
 157. WINKLER G.C., 1988. Pulmonary intravascular macrophages in domestic animal species: review of structural and functional properties. *Am J Anat* 181: 217–234.
 158. WOODARD JC, ZAM SG, CALDWELL DK, CALDWELL MC, 1969. Some parasitic diseases of dolphins. *Pathol. Vet. (Swiss)*, 6: 257-272.
 159. WURTZ M., MARRALE D., 1993. Food of striped dolphin, *Stenella coeruleoalba* in the Ligurian Sea. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 73: 571– 578.
 160. YABLOKOV A.V., BELKOVICH V.M., BORISOV V.I., 1974. Whales and dolphins. S. Joint publications research service, Cap. 6:128-150.
 161. YANG W. C., PANG V.F., JENG C.R., CHOU L.S., CHUEN L.L., 2006. Morbilliviral infection in a pygmy sperm whale (*Kogia breviceps*) from Taiwanese waters. *Vet Microbiol*, 116(1-3): 69-76.
 162. ZAGARIYA A., BHAT R., UHAL B., NAVALE S., FREIDINE M., VIDYASAGAR D. Cell death and lung cell histology in meconium aspirated newborn rabbit lung. *Eur J Pediatr*. 2000 Nov;159(11):819-26.

163. ZHU B.L., QUAN L., LI D.R., TANIGUCHI M., KAMIKODAI Y., TSUDA K., FUJITA M.Q., NISHI K., TSUJI T., MAEDA H., 2003. Postmortem lung weight in drownings: a comparison with acute asphyxiation and cardiac death. *Leg Med (Tokyo)*, 5(1):20-6.

WEBGRAFIA

- <http://www-1.unipv.it/webcib/spiaggiamenti.html> (Pagina web di Università di Pavia, Centro di raccolta dei dati sugli spiaggiamenti di mammiferi marini, Banca dati spiaggiamenti).
- <http://www.accobams.org/2006.php/pages/show/10> (Pagina web di ACCOBAMS).
- <http://www.mammiferimarini.sperivet.unipd.it/contatti/index.htm> (Pagina web di Banca Italiana Tessuti Mammiferi Marini, Università di Padova).