

Università degli Studi di Padova
Dipartimento di Biologia
Corso di Laurea in Biotecnologie



ELABORATO DI LAUREA

**Inclusion body disease nei rettili: dal campionamento
post-mortem alle tecniche di diagnosi molecolare.**

Relatore: Prof. Laura Cavicchioli

Dipartimento di Biomedicina comparata e Alimentazione

Laureando: Bertoncello Thomas

Anno Accademico 2022/2023

1. Abstract:

L'elaborato di tesi ha lo scopo di chiarire l'iter diagnostico utile per identificare e riconoscere precocemente Inclusion Body Disease una malattia che colpisce i serpenti, in particolare i Boidi, tra cui pitoni e boa. Gli esemplari di Boa e Pitone inclusi nel presente lavoro sono giunti presso il Dipartimento di Biomedicina comparata e alimentazione per sintomatologia, prevalentemente di tipo neurologico, compatibile con la malattia e sono stati sottoposti ad analisi necroscopica con l'obiettivo di raccogliere tessuti e organi aventi lesioni macroscopiche correlate ad una possibile manifestazione dell'IBD destinati alle successive analisi. I campioni sono stati sottoposti ad un'analisi istologica ed immunohistochimica (IHC), per identificare la presenza di agenti infettivi all'interno dei tessuti attraverso l'utilizzo di un anticorpo specifico. Sui tessuti sono state eseguite inoltre indagini virologiche e molecolari, così da confermare la presenza del virus responsabile della manifestazione dell'IBD.

L'IBD è una malattia causata dal Reptarenavirus che presenta in alcuni casi inclusioni localizzate nel SNC, o diffuse in più tessuti. Risulta necessario proseguire con gli studi non solo a scopo di riconoscimento della malattia, ma anche a scopo di ricerca, perchè attualmente le informazioni in possesso malattia risultano frammentarie e ambigue.

2. Stato dell'arte

2.1. *Inclusion Body Disease: agente eziologico*

L'inclusion body disease (IBD) è una delle malattie virali più note nei serpenti boidi e pitonidi con una distribuzione globale. Per quasi due decenni a partire dagli anni 90' l'agente eziologico responsabile della malattia rimase sconosciuto, vennero ipotizzati inizialmente come agenti eziologici causanti la malattia i Retrovirus, ma solo negli ultimi anni si è riusciti a dimostrare una relazione causale con i nuovi Arenavirus divergenti.

È stato scoperto infatti che il virus responsabile della malattia è il Reptarenavirus (precedentemente noto come Golden Gate Virus), un virus RNA negativo facente parte della famiglia degli Arenaviridae.

Da uno studio del 2015 (5) si è scoperto che il genoma del Reptarenavirus è RNA bisegmentato a senso negativo avente una strategia di codifica ambisenso. Il segmento S codifica il precursore della glicoproteina GPC e della nucleoproteina NP, mentre il segmento L codifica la proteina della matrice zinc-finger e la RNA polimerasi RNA dipendente. Lo studio ha inoltre constatato tramite un'analisi filogenetica che i segmenti di Reptarenavirus L e S differivano dai dati presenti in GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), suggerendo la presenza di nuove specie di Reptarenavirus mutate (5).

2.2. *Causa e trasmissione*

Da uno studio condotto su tessuti di serpenti positivi all'IBD (1) si è scoperto che i virus assomigliavano a Retrovirus di tipo C, come rilevato dall'analisi dell'attività della trascrittasi inversa nelle colture cellulari infette. Nonostante ciò è impossibile individuare un Retrovirus come eziologia di base in quanto in questo studio non era stato utilizzato un virus purificato. L'IBD potrebbe derivare da un accumulo di proteine indotto da un'infezione virale, oppure la proteina stessa potrebbe avere un comportamento simile a quello di una malattia prionica.

La via di trasmissione dell'IBD non è stata determinata anche se si ritiene che sia coinvolto il contatto diretto. Un'altra ipotesi è che gli acari, presenti in molte colonie di serpenti, possano fungere da agente di trasmissione del virus (1). Un'ulteriore possibilità è data dalla trasmissione per via verticale dalla madre ai piccoli, sia nei serpenti ovipari che in quelli vivipari (1).

2.3. Riduzione del rischio di IBD

Gli allevatori di serpenti si trovano ancora al giorno d'oggi in difficoltà a gestire un allevamento dove si è diffuso l'IBD tra gli esemplari. Ancora non esiste un protocollo diagnostico o clinico semplice da seguire, tuttavia ci sono diversi approcci che possono ridurre il rischio di introdurre l'IBD in un allevamento di serpenti.

È necessario introdurre un programma di medicina preventiva gestito da un veterinario esperto di rettili che possa agire diminuendo una possibile esposizione al virus da parte degli esemplari. È importante poi istituire una quarantena raccomandata a circa 90 giorni per i nuovi animali, così da ridurre il rischio di malattie infettive e la presenza di acari che possano trasmettere il virus.

A seconda delle possibilità finanziarie è consigliato inoltre eseguire dei test di valutazione dell'IBD, come l'analisi degli strisci di campioni di sangue che permettono di verificare la presenza di inclusioni nelle cellule del sangue; oppure l'ottenimento di campioni bioptici delle tonsille, del fegato e dei reni del serpente così da individuare tramite un esame ante mortem l'infettività di un animale (1)

Infine, i serpenti che mostrano segni clinici di malattia o anoressia non dovrebbero essere aggiunti alla collezione o all'allevamento, in quanto può presentarsi il rischio di infezione qual ora il serpente non sia esente dalla presenza di acari o sia contagioso.

2.4. Aspetti clinici e sintomatologia

I segni clinici dell'IBD riguardano principalmente lesioni al sistema nervoso centrale che possono causare torcicollo, disequilibrio, incapacità di raddrizzarsi da posizione supina, paralisi flaccida. I boa constrictor in particolare presentano come sintomo comune il rigurgito del cibo ingerito entro alcuni giorni dall'alimentazione. Alcuni esemplari muoiono entro poche settimane, altri possono sopravvivere anche diversi mesi con la possibile manifestazione di altri sintomi clinici come stomatite, polmonite, disturbi linfoproliferativi e tubercolosi. I valori ematologici e di analisi biochimiche hanno riscontrato come disturbi dovuti all'IBD la leucocitosi, la linfocitosi relativa, valori più bassi di proteine totali e globuline e valori di AST (aspartato transaminasi) significativamente più alti rispetto a serpenti non infettati.

Le inclusioni intracitoplasmatiche sono di dimensioni variabili e possono essere da eosinofile ad anfolitiche; la maggior parte delle inclusioni si osservano istologicamente all'interno dei neuroni del SNC ma possono trovarsi anche a livello delle cellule gliali con o senza infiammazione associata. In particolar modo nei Boa constrictor si possono riscontrare inclusioni anche in: cellule epiteliali

della mucosa adiacenti alle tonsille, cellule linfoidi nelle tonsille esofagee, cellule epiteliali che rivestono il tratto gastrointestinale, cellule epiteliali che rivestono il tratto respiratorio, epatociti, cellule acinari pancreatiche e cellule epiteliali tubulari renali (1).

In alcune sezioni delle inclusioni possono essere presenti profili concatenati con subunità osservabili in superficie.

3. Approccio sperimentale

3.1. Necropsia

Gli esemplari di Boa e Pitone sono giunti presso il Dipartimento BCA per essere sottoposti ad un'iniziale analisi necroscopica. L'esame esterno è la prima fase dell'analisi, il quale consiste nella misurazione della lunghezza del tronco, del corpo interno e nella pesatura del corpo. I dati ottenuti verranno poi inseriti nel referto necroscopico insieme a qualsiasi alterazione osservata macroscopicamente con una localizzazione il più possibile accurata.

Prima di tutti si esegue anche un prelievo di sangue dalla carcassa dell'animale per la preparazione di strisci di sangue su un vetrino per citologia utilizzando una tecnica standard a cuneo, facendoli essiccare all'aria per 24 ore e colorandoli seguendo un protocollo preciso. Questa tipologia di analisi ci permette di poter esaminare e verificare la presenza di inclusioni virali nei linfociti e negli eterofili.

Si prosegue poi con il posizionamento dell'animale in posizione dorsale reclinata e il taglio della pelle tramite una singola sezione che inizia tra i rami mandibolari e termina nell'area perianale, all'interno del quale si possono trovare feci che verranno rimosse. Gli organi vengono poi eviscerati in blocco successivamente al taglio della trachea e dell'esofago sezionando il tessuto connettivo dorsale. Il passo successivo consiste nell'aprire il pericardio e rimuovere il cuore, il quale è tricamerale (composto da due atri e un ventricolo) e posizionato solitamente tra il primo e il secondo quarto del corpo del serpente.

L'eviscerazione in blocco prosegue con la rimozione dei polmoni (di cui il sinistro è meno sviluppato del destro), del fegato (allungato e generalmente bilobato e preceduto da una cistifellea extraepatica situata caudalmente allo stomaco, del pancreas avente struttura multilobulare e della milza (ovoidale e rossastra). Infine si rimuoveranno il tratto digestivo composto da esofago, stomaco e intestino tenue e crasso, i reni multilobulari e di colore mattone, le ovaie solitamente appaiate e posizionate similmente ai reni o i testicoli.

Gli organi vengono fotografati per documentare ed inserire all'interno del referto necroscopico gli organi estratti e valutarne la loro condizione prima che questi

vengano messi in una soluzione di formalina tamponata al 10%, utile per la conservazione del campione.

3.2. Esame istologico ed immunoistochimico

3.2.1. Conservazione campioni

Dopo aver ottenuto i campioni di organi e tessuti dall'autopsia si prosegue attraverso alcune metodologie di conservazione che differiranno in base all'esame a cui il campione sarà sottoposto successivamente. I campioni di organi e tessuti di tutti i serpenti vengono fissati in formalina tamponata al 10% per l'esame istologico. La formalina è una soluzione chimica a base di formaldeide presente in stato liquido a temperatura ambiente che viene comunemente utilizzata per la conservazione e la disinfezione di campioni biologici. Tale sostanza è tossica, irritante e potenzialmente cancerogena; per questo motivo, dopo aver inserito un volume pari a 10 volte il volume del campione da conservare, il contenitore a chiusura ermetica così da evitare la dispersione di vapori che possono risultare irritanti per le vie oculare e nasale deve essere prontamente richiuso.

3.2.2. Preparazione dei vetrini

I campioni di organo conservati in formalina vengono trasferiti al laboratorio di istopatologia veterinaria del Dipartimento BCA. I preparati vengono tagliati sotto cappa aspirante e vengono successivamente posti in biocassette di grandezza adatta alla dimensione del tratto tagliato. Le biocassette vengono fissate in formalina e, successivamente, sono poste in un processatore che, tramite un procedimento ciclico, disidrata completamente il campione dall'acqua e dalla formalina per poi essere immerso in una soluzione di alcol con scala di gradazione crescente. Questo processo di disidratazione è utile in quanto le sostanze includenti presentano caratteristiche idrofobiche, di conseguenza non penetrerebbero i tessuti in presenza di acqua. In alcuni casi viene utilizzato anche lo xilene, una sostanza diafanizzante in grado di eliminare completamente l'acqua. La biocassetta viene poi riempita con paraffina liquida a circa 57-59°C che, raffreddandosi, passa allo stato solido (è importante che la paraffina abbia una temperatura bassa in quanto l'aumento della temperatura può portare ad una successiva formazione di foglietti ripiegati su sé stessi che renderebbero difficoltosa la preparazione del vetrino, in quanto la paraffina a temperature più elevate assume caratteristiche simili a quelle delle cere).

Alla completa solidificazione del blocchetto di paraffina con al suo interno il tessuto si procede al taglio dei foglietti di paraffina attraverso il microtomo, uno strumento che impiega una lama monouso per ottenere foglietti di paraffina aventi uno spessore tra i 3 e i 5 micrometri. I foglietti verranno poi fatti aderire al

vetrino portaoggetti successivamente ad un passaggio in una vasca contenente acqua distillata tiepida per favorire l'adesione del foglietto al vetrino.

Si eseguirà poi, tramite uno strumento automatizzato, la colorazione con ematossilina-eosina che, tramite l'ematossilina (colorante basico a base d'acqua), colorerà di blu i nuclei e le membrane cariche negativamente; mentre tramite l'eosina (colorante a base alcolica) colorerà di rosso/rosato il citoplasma carico positivamente, da cui si riuscirà poi a distinguere il collagene, le proteine cellulari e mitocondriali.

Durante la colorazione il vetrino verrà reidratato, di conseguenza precedentemente alla colorazione si riscalda il vetrino in stufa a 70°C per sciogliere ed eliminare la paraffina rimasta sul vetrino.

Perché la colorazione avvenga correttamente è necessario eseguire alcuni passaggi minuziosamente:

- Sparaffinatura ed idratazione: i vetrini con il preparato istologico sono immersi in una soluzione di xilolo per 5 minuti per favorire l'eliminazione della paraffina rimasta per poi essere immersi in soluzioni di etanolo a concentrazioni sempre minori (da 100° a 75°) per 2 minuti a soluzione, utile per la reidratazione del vetrino. Infine si esegue un'immersione prima in acqua di fonte per 15 secondi e poi in acqua distillata per 20 secondi.

- Colorazione: si immerge il vetrino nel primo colorante, l'ematossilina, per circa 5 minuti e successivamente in acqua di fonte per 7 minuti che, essendo leggermente alcalina, consente il viraggio del colore dei nuclei e delle membrane da violaceo ad azzurrino. Si immerge poi il vetrino in acqua distillata per eliminare i sali ancora presenti sul vetrino e si immerge per 50 secondi il vetrino nel secondo colorante, l'eosina.

- Disidratazione: si immerge il vetrino in soluzioni di etanolo a concentrazioni sempre maggiori per circa 30 secondi/1 minuto a soluzione e, successivamente, in xilolo per 4 minuti per riottenere la disidratazione del vetrino, i quali saranno pronti per il montaggio sotto cappa aspirante.

Per effettuare correttamente il posizionamento del vetrino coprioggetti si asciuga il vetrino per poi mettere in posizione centrale una goccia di colla trasparente; il vetrino viene poi bagnato con una soluzione di xilene e si pone il vetrino coprioggetto leggermente inclinato per evitare la formazione di bolle d'aria.

Dopo 24 ore la colla avrà aderito completamente al vetrino e potrà essere osservato al microscopio e dopo 48 ore sarà pronto per la spedizione.

3.2.3. Esame immunoistochimico (IHC)

L'immunoistochimica è una tecnica utilizzata in biologia e patologia per rilevare specifiche proteine o antigeni all'interno dei tessuti biologici utilizzando anticorpi. Questa tecnica combina principi dell'immunologia e dell'istochimica per consentire la localizzazione e la visualizzazione di molecole specifiche all'interno delle cellule e dei tessuti attraverso l'utilizzo di coloranti. Viene utilizzato un anticorpo primario il quale si legherà agli antigeni tissutali, questo ci servirà in quanto successivamente si andrà ad inserire l'anticorpo secondario che andrà a riconoscere la reazione immunitaria avvenuta tra l'antigene e l'anticorpo primario. Questa reazione sarà coniugata ad un enzima catalizzatore che formerà un precipitato insolubile visibile al microscopio ottico.

I campioni destinati all'analisi immunoistochimica in fase di montaggio vengono fatti aderire sulla superficie del vetrino sfruttando la carica elettrostatica del vetrino stesso per evitare il distacco del campione a seguito del trattamento termico e chimico, successivamente tramite la colla viene fatto aderire il vetrino coprioggetto leggermente inclinato per evitare la formazione di bolle d'aria.

Nel presente lavoro è stato seguito un protocollo eseguito tramite l'utilizzo di un immunocoloratore semiautomatico che, rispetto all'IHC eseguita tramite tecnica manuale, ci consente di ottenere risultati più rapidi e riproducibili andando a semplificare processi che risulterebbero complicati manualmente.

L'immunocoloratore del laboratorio di Patologia Veterinaria del Dipartimento BCA è un Ventana Benchmarck GX che permette l'analisi di un numero massimo di 20 vetrini simultaneamente. Questa tipologia di immunocoloratore è caratterizzata dalla presenza di un laser che permette la lettura dei codici a barre presenti sui vetrini per l'identificazione del campione e sui reagenti.

I reagenti sono riposti all'interno di taniche sottostanti alla piastra con i vetrini e, tramite una pressurizzazione, vengono erogati sui vetrini.

All'interno delle taniche sono contenuti i seguenti liquidi:

- 1) EZ-PREP: soluzione in grado di rimuovere la paraffina dai campioni di tessuto, eliminando quindi la sostanza lipofila che non permetterebbe il legame con coloranti ed anticorpi.
- 2) LCS: soluzione utilizzata per impedire l'evaporazione dei reagenti
- 3) 2X SSC: soluzione tampone salina contenente sodio e citrato
- 4) CC1: sostanza tampone con pH leggermente alcalino, idrolizza i legami covalenti della formalina consentendo la rinaturazione delle molecole e facilita l'accesso degli anticorpi

5) CC2: sostanza tampone con pH leggermente acido, idrolizza anch'esso i legami covalenti della formalina a temperature elevate

6) Reaction Buffer: soluzione tampone che permette il mantenimento di un ambiente acquoso stabile.

Il kit di rivelazione utilizzato nell'analisi è l'ultraView™ Universal composto da:

- DAB chromogen: sostanza che, quando reagisce con determinati reagenti, produce una colorazione visibile. In immunistoichimica è utilizzato per evidenziare la presenza di un antigene specifico legato ad un anticorpo primario.
- HRP Multimer: anticorpo secondario
- DAB Copper: solfato di rame utile per il viraggio ad un colore più acceso
- DAB H2O2: bersaglio della perossidasi
- DAB Inhibitor: inibitore delle proteasi endogene che possono trovarsi all'interno del tessuto e dare colorazioni differenti che l'immunocoloratore non è in grado di distinguere dalle colorazioni sperimentali.

Procedura: dopo aver riposto in stufa per qualche minuto (5-6 minuti) i vetrini per eliminare l'umidità residua si procede con l'inserimento dei vetrini campione nell'immunocoloratore. Oltre ai vetrini vengono inseriti anche un controllo positivo, ovvero un campione di tessuto dove si ha la certezza che la reazione avvenga e un controllo negativo o bianco, ovvero una copia del campione dove non viene inserito l'anticorpo primario, così da riuscire a distinguere le successive marcature nei campioni.

Riposti i campioni prima dell'inizio dell'analisi l'immunocoloratore controlla il posizionamento dei vetrini, legge i reagenti presenti nel carosello e, in caso di utilizzo di un nuovo kit, esegue un quality check meccanicamente riempiendo il beccuccio con il reagente in modo di avere la certezza che prelevi il volume corretto di reagente. Con l'inizio del ciclo abbiamo innanzitutto la rimozione della paraffina attraverso l'EZ-PREP, l'inibizione della perossidasi endogene tramite l'H2O2, lo smascheramento dei siti antigenici tramite CC1 e CC2 fino ad arrivare all'aggiunta dell'anticorpo primario, unico procedimento manuale. Questo procedimento consiste nel depositare tramite una micropipetta al centro del vetrino 100 microlitri di una soluzione contenente l'anticorpo primario e il diluente. Si riprende poi la fase ciclica con l'aggiunta in automatico dell'anticorpo secondario ed infine l'aggiunta del substrato cromogeno, il quale reagirà con la perossidasi coniugata con l'anticorpo secondario dando un precipitato insolubile colorato visibile al microscopio ottico. L'intero ciclo dura circa 60/80 minuti fino all'aggiunta dell'anticorpo primario più altri 60 minuti per il completamento dell'analisi.

L'IHC non è stata eseguita in questo studio a causa della mancanza dell'anticorpo, nonostante ciò il procedimento è stato inserito nell'elaborato di tesi in quanto le precedenti nozioni sono state acquisite su altra specie animale durante il periodo di tirocinio presso il laboratorio di istopatologia veterinaria del Dipartimento BCA.

4. Risultati e discussione

Lo studio all'interno del quale si inserisce la presente tesi ha come scopo finale l'identificazione, tramite esami batteriologico, virologico ed istologico, dell'IBD in 25 serpenti con sintomatologia riconducibile ad un'infezione da Reptarenavirus. Quattro esemplari di *Boa constrictor* (campioni 2, 3, 8 e 9) e l'unico esemplare di *Simalia amethystina* (14) presentavano una deformazione della colonna vertebrale, 7 esemplari di *Python regius* (5, 6, 7, 10, 12, 23, 24, 25) presentavano sintomi respiratori. Come sintomatologie meno comuni invece sono state diagnosticate dermatite nel caso 11, sintomi neurologici nei casi 2,3,4,7 e 11, panoftalmite e granuloma labiale nel caso 15, perdita di peso progressiva nei casi 1 e 20 e sintomi renali nel caso 16. nella tabella 1 sono riportate le 25 specie di serpente prese in esame facendo riferimento a sesso, lunghezza e peso di ogni campione. Questi dati sono poi stati inseriti nel referto necrologico ed inviati al laboratorio di istopatologia veterinaria del dipartimento BCA per le successive analisi.

<i>N° caso</i>	<i>Specie</i>	<i>Sesso</i>	<i>Lunghezza (cm)</i>	<i>Peso (kg)</i>
1	Boa constrictor	M	159	1,45
2	Boa constrictor	F	215	3,8
3	Boa constrictor	F	180	2
4	Boa constrictor	F	240	10,7
5	Python regius	F	125	1,7
6	Python regius	F	130	1,55
7	Python regius	F	133	1,7
8	Boa constrictor	F	160	1,6
9	Boa constrictor	M	150	2,5
10	Boa constrictor	F	168	1,95
11	Boa constrictor	M	223	4,45
12	Python regius	F	146	1,25
13	Boa constrictor	M	225	5,05
14	Simalia amethystina	M	297	4,35
15	Pitone morulo	ND	/	8,5
16	Boa constrictor	F	/	/
17	Boa constrictor	F	/	/
18	Boa constrictor	ND	/	3,25
19	Boa constrictor	M	/	2,6
20	Boa constrictor	F	228	3,55
21	Boa constrictor	F	242	7,6
22	Python regius	M	100	0,9
23	Python regius	F	132	1,85
24	Python regius	M	106	0,95
25	Python regius	F	143	2,2

Tabella 1: *Esemplari inclusi nello studio con riferimento a specie, sesso, lunghezza e peso*

4.1. Esame virologico e batteriologico

L'esame virologico permette di verificare la positività del campione non solo nei confronti dell'Arenavirus ma anche nei confronti di Adenovirus, Paramyxovirus e Reovirus. Per ogni soggetto il test è stato eseguito effettuando una PCR su campioni prelevati dal SNC, dal fegato, dal polmone, dal rene e dall'intestino. I risultati hanno determinato la positività per infezione da Arenavirus in almeno uno dei campioni prelevati per 6 esemplari di *Boa constrictor* (n°1,2,3,4,11 e 13) e per 6 esemplari di *Python regius* (n°5, 6,7,22,23 e 24). Un caso particolare è l'esemplare di *Python regius* n°7, il quale è risultato negativo alla presenza di Arenavirus ma è stata individuata la presenza del virus nei suoi acari.

Il tampone batteriologico è un test che viene sempre eseguito in studi patologici veterinari; in questo studio alcuni soggetti presentavano sintomatologia respiratoria, l'esame batteriologico ha avuto anche lo scopo di scoprire se questo tipo di sintomatologia derivasse da un'infezione virale oppure da un'infezione batterica da *Mycoplasma*. Particolare attenzione va prestata agli esemplari di *Python regius* n° 5,6 e 7 i quali hanno riscontrato una positività al tampone batteriologico per *Mycoplasma* a livello intestinale. Questa infezione batterica potrebbe essere la causa della sintomatologia respiratoria riscontrata nei soggetti che potrebbe escludere un collegamento con l'infezione da Arenavirus.

4.2. Esame istologico e correlazione alla positività per Arenavirus

L'esame istologico permette di verificare la presenza di lesioni e in particolare dei corpi inclusi all'interno dei tessuti tramite l'osservazione a microscopio ottico dei vetrini colorati con ematossilina ed eosina. Si è potuta associare la presenza dei corpi inclusi e le lesioni osservate alla positività per Arenavirus riscontrata dal test virologico, così da poter dichiarare con maggiore sicurezza che la sintomatologia che ha portato alla morte dell'esemplare di serpente fosse dovuta ad una manifestazione dell'IBD.

L'esame istologico è stato eseguito su tutti i 25 esemplari, andando ad analizzare per ogni esemplare un campione tissutale di: polmone, fegato, rene, cervello, cuore, intestino, stomaco, milza e pelle. I risultati ottenuti hanno confermato la presenza di lesioni e di corpi inclusi in alcuni campioni positivi ad Arenavirus, ma è stata rilevata la presenza di corpi inclusi anche in campioni negativi all'Arenavirus (n°10, 20, 21). Inoltre, per gli esemplari di *Python regius* n°22, 23 e 24 risultati positivi all'Arenavirus, non è stata riscontrata la presenza di corpi inclusi. Nella Tabella 2 sono riportati gli esemplari positivi e negativi ad Arenavirus che hanno manifestato la presenza di corpi inclusi rilevati tramite l'esame istologico.

N° Caso	Corpi Inclusi	Virologico
1	NO	POSITIVO (intestino)
2	SI (intracitoplasmatici: cellule epiteliali ciliate dei bronchioli, epatociti , cellule epiteliali tubulari, cellule neuronali e gliali, enterociti, eterofili)	POSITIVO (polmone, fegato, rene, cervello, intestino)
3	SI (intracitoplasmatici: cellule epiteliali ciliate dei bronchioli, epatociti, cellule epiteliali tubulari, cellule neuronali e gliali, enterociti, eterofili) (vedi Figura 1)	POSITIVO (polmone, fegato, rene, cervello, intestino)
4	NO	POSITIVO (fegato)
5	NO	POSITIVO (rene)
6	NO	POSITIVO (cervello, intestino)
7	NO	POSITIVO (intestino)
8	NO	NEGATIVO
9	NO	NEGATIVO
10	SI (intracitoplasmatici: epatociti e cellule del dotto biliare, cellule epiteliali tubulari, eterofili, cellule gliali, enterociti)	NEGATIVO
11	SI (intracitoplasmatici: cellule epiteliali ciliate dei bronchioli, epatociti, cellule epiteliali tubulari, cellule neuronali e gliali, enterociti, eterofili, rari in cheratinociti) (Vedi Figure 2 e 4)	POSITIVO (polmone, fegato, rene, cervello, intestino)
12	NO	NEGATIVO
13	SI (cellule infiammatorie polmonari)	POSITIVO (polmone, fegato,

		rene, cervello, intestino)
14	NO	NEGATIVO
15	NO	NEGATIVO
16	NO	NEGATIVO
17	NO	NEGATIVO
18	NO	NEGATIVO
19	NO	NEGATIVO
20	SI (intracitoplasmatici: cellule epiteliali ciliate dei bronchioli, epatociti, cellule epiteliali tubulari, cellule neuronali e gliali, enterociti) (Vedi Figura 3)	NEGATIVO
21	SI (intracitoplasmatici: cellule epiteliali ciliate dei bronchioli, epatociti, cellule epiteliali tubulari, cellule neuronali e gliali, enterociti)	NEGATIVO
22	NO	POSITIVO (polmone, fegato, rene, cervello, intestino)
23	NO	POSITIVO (polmone, fegato, rene, cervello, intestino)
24	NO	POSITIVO (polmone, fegato, rene, cervello, intestino)
25	NO	NEGATIVO

Tabella 2: Evidenza istologica della presenza di corpi inclusi in esemplari positivi e negativi per *Reptarenavirus*.

Le lesioni individuate dall'esame istologico sui campioni positivi al test virologico e/o manifestanti i corpi inclusi, sono di gravità variabile.

A livello polmonare molti campioni presentano una congestione vascolare diffusa con gravità da lieve a moderata, nei casi più gravi invece si manifesta edema

polmonare, polmonite eterofilica (figura 5) e nel campione n°21 polmonite cronica, edema polmonare grave con presenza abbondante di muco.

A livello del fegato sono stati individuati pigmenti marroni granulari multifocali a livello dei macrofagi, oltre alla presenza in alcuni campioni di cellule infiammatorie multifocali linfocitiche e istiocitiche con piccole zone di necrosi.

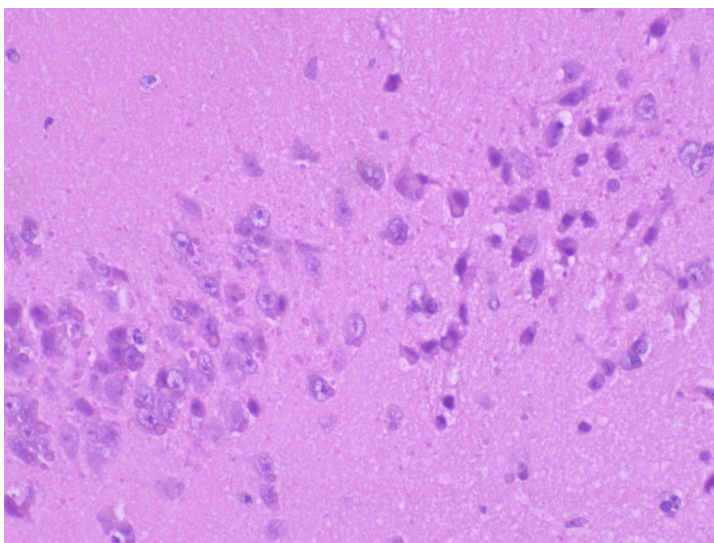
A livello renale sono stati individuati pigmenti marroni granulari a livello delle cellule epiteliali tubulari, oltre alla presenza di linfociti multifocali e, in alcuni casi, manifestazione di fibrosi pretubulare lieve e nefrite linfocitica.

A livello cerebrale non si è ottenuto un risultato chiaro dall'esame istologico ma si sospetta la manifestazione di una gliosi cerebrale in alcuni campioni.

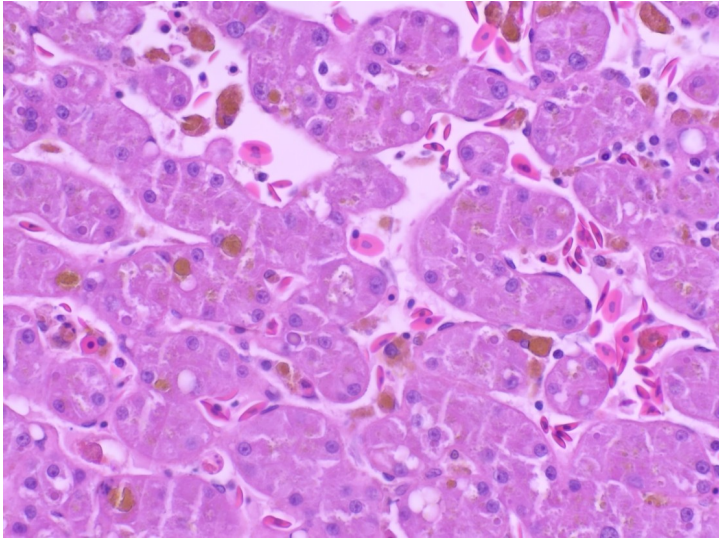
A livello intestinale alcuni campioni presentano un'enterite linfoplasmatica, fino ad arrivare nel campione n°13 all'enterite cronica con conseguente infiammazione grave del primo tratto dell'intestino.

Il campione n°13 presenta anche a livello dello stomaco una grave gastrite linfocitica. A livello epiteliale alcuni esemplari presentano dermatite multifocale (n°11), edema subcutaneo multifocale (n°17) aree necrotiche con presenza di granulomi e ipercheratosi (n°20) e assottigliamento della pelle cheratinizzata (n°19)

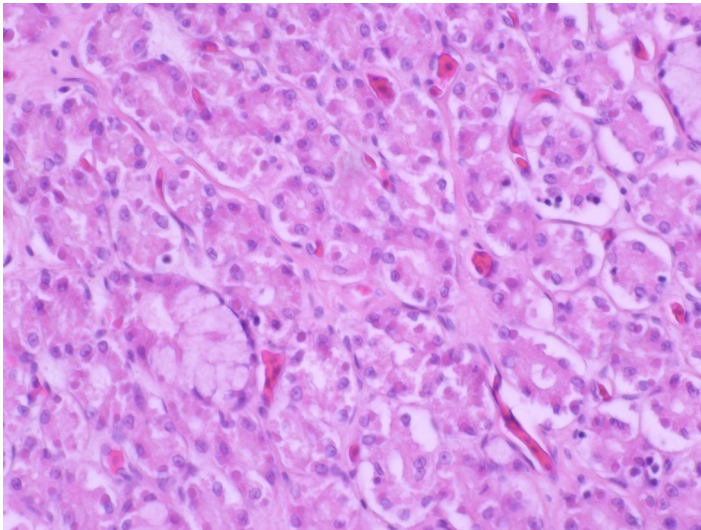
Di seguito sono riportate alcune immagini che mostrano la positività ad IBD per la presenza di corpi inclusi nel tessuto analizzato.



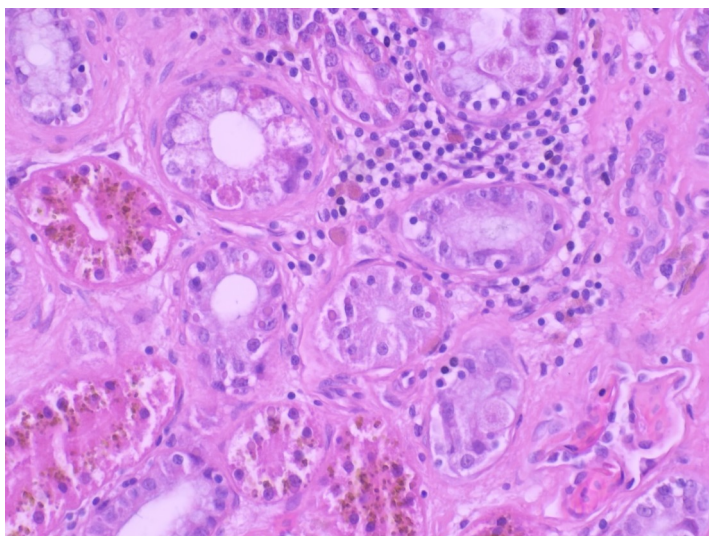
**Figura 1: Esempio 3 (*Boa constrictor*), SNC, HE (40X):
IBD corpi inclusi
intraneuronali**



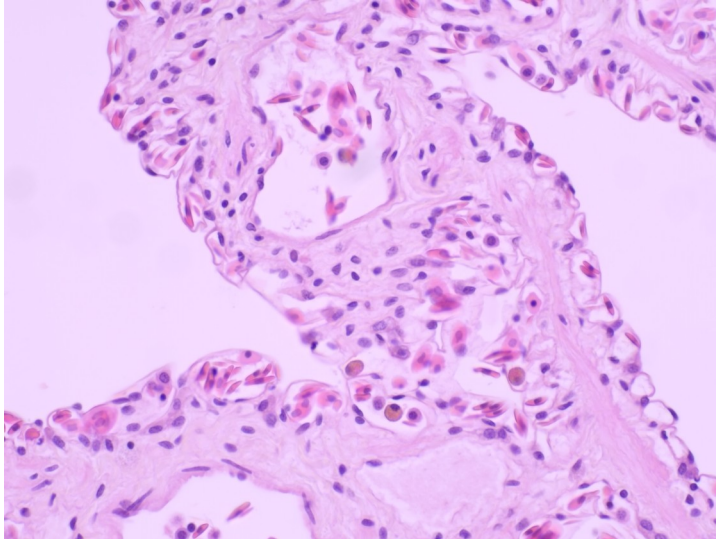
**Figura 2: Esempio 11
(Boa constrictor), fegato,
HE (40X): IBD corpi inclusi
intraepatocitari.**



**Figura 3: Esempio 20
(Boa constrictor),
intestino, HE (40X): IBD
corpi inclusi intraepiteliali.**



**Figura 4: Esempio 11
(Boa constrictor), rene,
HE (40X): IBD corpi inclusi
intraepiteliali**



**Figura 5: Esempio 22
(Python regius),
polmone, HE (40X):
polmonite eterofilica**

4.4. Considerazioni finali

Questo studio ha permesso di individuare efficacemente la presenza dell'Arenavirus responsabile dell'IBD nei campioni istologici. È importante sottolineare però come sia attualmente complicato identificare con certezza l'infezione virale a seguito della manifestazione dei primi sintomi negli esemplari di serpenti. Dai dati conseguiti da precedenti studi e anche dal nostro studio si è potuto confermare che l'IBD si manifesta con la formazione di inclusioni intracitoplasmatiche visibili e/o non visibili microscopicamente situate in tessuti differenti. Infatti, come anche il nostro studio ha confermato, la comparsa delle inclusioni può portare ad una sintomatologia differente a seconda del tessuto colpito; da problemi neurologici a respiratori, a dermatiti, perdita di peso e forme di disequilibrio, oltre a danni a livello della colonna vertebrale.

La varietà di questi sintomi può causare difficoltà nel riconoscimento della malattia, soprattutto per allevatori, veterinari ed animal carers; per questo motivo è molto importante proseguire con gli studi riguardanti l'IBD per permettere in futuro una più facile identificazione dell'infezione e, di conseguenza, un'attuazione di metodologie di prevenzione sempre più efficaci, così da riuscire a tutelare gli allevatori in caso di infezione e ad aumentare la precisione e l'accuratezza di una diagnosi e una prognosi da parte del veterinario.

5) Bibliografia

- 1) Li-Wen C, Jacobson E.R. *Inclusion Body Disease, A Worldwide Infectious Disease of Boid Snakes: A Review*, Journal of Exotic Pet Medicine Vol 19, 2010, 216-225
- 2) Simard J, Marschang R.E, Leineweber C, Hellebuyck T, *Prevalence of inclusion body disease and associated comorbidity in captive collections of boid and pythonid snakes in Belgium*, Pierre Rocques, CEA, FRANCE, Journal Plos One, 2020, 15(3)
- 3) Alfaro-Alarcon A, Hetzel U, Smura T, Baggio F, Morales J.A, Kipar A, Hepojoki J, *Boid Inclusion Body Disease Is Also a Disease of Wild Boa Constrictors*, Frederick S.B.Kibenge, University of Prince Edward Island, Microbiology Spectrum, 2022
- 4) Rizac R.I, Ciobotaru-Pirvu E, Militaru M, *Necropsy Technique In Reptiles: Review*, Rev Rom Med Vet, 2020, 30/1 5-12
- 5) Argenta F.F, Hepojoki J, Smura T, Szivovicza L, Hammerschmitt M.E, Driemeier D, Kipar A, Hetzel U, *Identification of Reptarenavirus, Hartmaniviruses, and a Novel Chuvirus in Captive Native Brazilian Boa Constrictors with Boid Inclusion Body Disease*, Julie K.Pfeiffer University of Texas Southwestern Medical Center, Journal of Virology, 2020.