



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
Dip. di Medicina Animale, Produzioni e Salute
Dip. di Biomedicina Comparata e Alimentazione

Corso di laurea magistrale a ciclo unico in
MEDICINA VETERINARIA

STUDIO ISTOPATOLOGICO E
IMMUNOISTOCHEMICO DI LESIONI
PANCREATICHE IN TACCHINI
SPERIMENTALMENTE INFETTI CON VIRUS
INFLUENZALI AVIARI

Relatore
Prof. Valentina Zappulli

Correlatore
Dott. Laura Cavicchioli
Dott. Giorgia Beffagna

Laureanda
Laura Nordio
Matricola n. 613796

ANNO ACCADEMICO 2013-2014

Abstract

The avian pancreas is made of an exocrine portion with role in digestion (the pancreatic acini) and an endocrine portion with role in glucose metabolism (the A islets, mainly glucagon-secreting, and the B islets, mainly insulin-secreting). It has been sporadically reported that the pancreas may be involved in case of low pathogenic avian influenza (LPAI) in the turkey.

In this work we performed histopathological and immunoistochemical analysis on pancreatic samples from 28 turkeys experimentally infected with H7N1 and H7N3 LPAI viruses and from 2 negative controls turkeys in order to describe lesions due to LPAI infection and to investigate a possible correlation between influenza virus infection and onset of pancreatic diseases such as pancreatitis and diabetes. Samples analysis showed that most cases had histological signs of pancreatitis (22/28, 78,6%). The samples analyzed were divided into three groups based on the day post infection (dpi) which were collected in: the early stage (4-7 dpi), the intermediate stage (8-17 dpi) and the late stage (39 dpi). Samples collected in the early stage showed acute necrotizing pancreatitis with necrosis, edema and heterophilic inflammation. Samples from the intermediate stage showed, in addition to the features described above, ductular hyperplasia and mitosis in the exocrine pancreas; whereas in the late stage (39 dpi) chronic pancreatitis with lymphoplasmacytic infiltrate and fibrosis was observed. Immunoistochemistry (IHC) performed to detect viral localization in the pancreas revealed viral tropism for cells of the exocrine pancreas in 6 of 28 samples (21,4%), all collected between 4 and 9 dpi (the percentage of positivity to the virus in the early stage was 30,8%). Although this study didn't highlight the endocrine pancreas as a target of viral replication, IHC for glucagon and insulin suggested first the destruction and then the regeneration of the islets, clinically associated with transient hyperglycemia in some animals. Our findings therefore indicate that viral infection directly affects the exocrine pancreas but may also have indirect effects on the endocrine pancreas, which, however, once passed the acute phase of infection, may undergo regenerative phenomena together with the exocrine. This regenerative capacity of the avian pancreas might prompt interesting comparative studies of the control mechanisms of this impressive phenomenon.

Il pancreas aviare è costituito da una porzione esocrina con ruolo nella digestione (gli acini pancreatici) e da una porzione endocrina con ruolo nel metabolismo del glucosio (le isole A, principalmente glucagone-secerenti, e le isole B, principalmente insulina-secerenti). È stata segnalata in maniera sporadica la possibilità che il pancreas possa essere coinvolto in caso di influenza aviare a bassa patogenicità (LPAI) nel tacchino.

In questo lavoro di tesi sono stati eseguiti esami istopatologici e immunohistochimici sui pancreas di 28 tacchini infettati sperimentalmente con virus LPAI H7N1 e H7N3 e di 2 tacchini controlli negativi allo scopo di descrivere le lesioni dovute a infezione LPAI e di studiare la possibile correlazione tra l'infezione da virus influenzale e l'insorgenza di patologie pancreatiche quali pancreatite e diabete. L'analisi dei campioni ha mostrato nella maggior parte dei casi segni istologici di pancreatite (22/28, 78,6%). I campioni analizzati sono stati suddivisi in tre gruppi, sulla base del giorno post infezione (dpi) al quale sono stati prelevati: fase precoce (4-7 dpi), fase intermedia (8-17 dpi) e fase tardiva (39 dpi). I campioni prelevati nella fase precoce hanno mostrato pancreatite necrotizzante acuta con necrosi, edema e infiammazione eterofilica. I campioni prelevati nella fase intermedia hanno mostrato, oltre alle caratteristiche descritte sopra, anche iperplasia dei duttuli e mitosi nel pancreas esocrino, mentre nei campioni della fase tardiva si è osservata pancreatite cronica con infiltrato linfoplasmacellulare e fibrosi. L'immunohistochimica (IHC) eseguita per evidenziare la localizzazione del virus nel pancreas ha rivelato un tropismo del virus stesso per le cellule del pancreas esocrino in 6 campioni su 28 (21,4%), tutti prelevati tra 4 e 9 dpi (la percentuale di positività al virus nella fase precoce è stata 30,8%). Nonostante questo studio non abbia identificato il pancreas endocrino come un target di replicazione per il virus influenzale, le IHC per glucagone e insulina hanno suggerito un processo prima di distruzione e poi di rigenerazione delle isole, associato clinicamente ad una iperglicemia transitoria in alcuni animali. I risultati indicano, pertanto, che l'infezione virale colpisca direttamente il pancreas esocrino ma possa anche avere delle ripercussioni indirette sul pancreas endocrino, il quale, tuttavia, una volta superata la fase acuta di infezione, può andare incontro a fenomeni rigenerativi così come l'esocrino. Questa capacità rigenerativa del pancreas aviare potrebbe stimolare interessanti studi comparativi sul meccanismo di controllo di questi fenomeni rigenerativi.

Sommario

Abstract	iii
1. INTRODUZIONE	1
<i>1.1 IL PANCREAS NELLE SPECIE AVIARI</i>	<i>1</i>
1.1.1 ANATOMIA	1
Anatomia macroscopica	1
Anatomia microscopica	3
1.1.2 FISILOGIA	5
Pancreas esocrino	5
Pancreas endocrino	7
1.1.3 PATOLOGIA	11
Lesioni pancreatiche in corso di influenza aviare	13
<i>1.2 L'INFLUENZA AVIARE</i>	<i>14</i>
1.2.1 EZIOLOGIA E BASI DELLA PATOGENICITÀ	14
1.2.2 ECOLOGIA ED EPIDEMIOLOGIA	17
1.2.3 PATOGENESI	19
1.2.4 SINTOMI	20
1.2.5 LESIONI ANATOMOPATOLOGICHE	21
Lesioni macroscopiche	21
Lesioni microscopiche	22
1.2.6 CENNI SULLE EPIDEMIE DI H7N1 (1999-2001) E H7N3 (2002-2004) IN ITALIA	23
2. SCOPO DELLA TESI	27
3. MATERIALI E METODI	29
<i>3.1 CAMPIONAMENTO</i>	<i>29</i>
<i>3.2 ESAME ISTOPATOLOGICO</i>	<i>30</i>
Valutazione della fibrosi	31
Valutazione semi-quantitativa di lesioni pancreatiche	32

<i>3.3 ESAME IMMUNOISTOCHIMICO</i>	33
3.3.1 TECNICA IMMUNOISTOCHIMICA AUTOMATICA	33
IHC glucagone	34
IHC insulina	34
Valutazione delle positività e analisi statistica	35
3.3.2 TECNICA IMMUNOISTOCHIMICA MANUALE	36
4. RISULTATI	39
<i>4.1 ESAME CLINICO, MOLECOLARE E EMATOBIOCHIMICO</i>	39
<i>4.2 ESAME ISTOPATOLOGICO</i>	41
<i>4.3 ESAME IMMUNOISTOCHIMICO</i>	50
4.3.1 IHC VIRUS	50
4.3.2 IHC INSULINA E GLUCAGONE	51
5. DISCUSSIONE	55
6. CONCLUSIONI	67
Bibliografia	69
Appendice	81
Ringraziamenti	85

1. INTRODUZIONE

1.1 IL PANCREAS NELLE SPECIE AVIARI

Il pancreas è una ghiandola di grandi dimensioni annessa all'apparato digerente. È formato da una porzione esocrina ed una porzione endocrina. La principale funzione della parte esocrina è quella di produrre succhi digestivi chiamati succo pancreatico, mentre la parte endocrina è formata dalle isole di Langerhans e secerne ormoni importanti nel metabolismo del glucosio, insulina e glucagone (Dyce et al., 2008). Il succo pancreatico ha la funzione di digerire alcune sostanze nell'intestino tenue, mentre l'insulina ed il glucagone hanno come principale funzione quella di controllare la concentrazione di glucosio nel sangue.

1.1.1 ANATOMIA

Anatomia macroscopica

Il pancreas è un organo parenchimoso localizzato nello spazio delimitato dall'ansa duodenale. Esso è suddiviso in tre lobi distinguibili per conformazione, indipendenza del dotto pancreatico e distribuzione delle isole pancreatiche: i lobi sono indicati come dorsale, ventrale e splenico (Hazelwood, 2000). Il lobo dorsale e il lobo ventrale costituiscono i due lobi principali, i quali, seguendo il decorso dell'ansa, si sviluppano dall'apice del duodeno discendente fino all'estremità del duodeno ascendente, punto di sbocco dei dotti pancreatici (Hazelwood, 2000). Il lobo splenico è di dimensioni più contenute e si estende dorsalmente in direzione della milza (Clara, 1924). Mikami e Ono hanno identificato anche un quarto lobo, una porzione del lobo ventrale riconosciuta come indipendente in funzione della diversa distribuzione delle isole e chiamata "terzo lobo" (Mikami e Ono, 1962) (Figura 1).

Il pancreas embrionale origina da due evaginazioni dell'endoderma dell'intestino primitivo. L'abbozzo pancreatico dorsale compare per primo, al terzo giorno, a partire dal duodeno embrionale in una zona anteriore all'abbozzo epatico, mentre l'evaginazione ventrale origina posteriormente, al quarto giorno. Le due anse quindi si fondono formando un singolo organo lobulare (Hazelwood, 2000). L'ansa ventrale darà origine ai lobi dorsale e ventrale mentre

l'ansa dorsale darà origine ai lobi splenico e terzo. Le cellule degli abbozzi proliferano formando dotti, acini e cellule endocrine già competenti: nell'abbozzo di lobo ventrale si sviluppano particolarmente i dotti pancreatici, mentre nel lobo dorsale prevale proporzionalmente la crescita di tessuto endocrino (Manáková e Titlbach, 2007).

Il pancreas è una ghiandola che presenta una porzione esocrina ed una endocrina. Lo stroma è costituito da una capsula da cui originano sottili setti di tessuto connettivo che dividono il parenchima in lobi. La componente esocrina è divisa allo stesso modo in lobuli composti da adenomeri e da un sistema di dotti confluenti a diametro crescente (Dellmann e Eurell, 2000). I dotti pancreatici sono deputati al drenaggio dei succhi pancreatici: nel pollame domestico sono tre (Mikami e Ono, 1962), ossia i dotti pancreatici dorsale e ventrale, drenanti i rispettivi lobi, più un dotto più piccolo per il lobo terzo. In alcune specie, come nell'oca, ne sono riportati solo due (Gülmez, 2003). Essi sfociano nella porzione distale del duodeno ascendente (o, più raramente, a livello di ansa duodenale discendente); dotti pancreatici e dotti biliari si aprono nel lume intestinale in zone adiacenti oppure tramite una papilla comune (Denbow, 2000).

La vascolarizzazione pancreatica è rappresentata dalle arterie pancreaticoduodenali, originate dalle diramazioni delle arterie celiaca e mesenterica craniale, mentre i rami venosi confluiscono nella vena porta (Dyce et al., 2008).

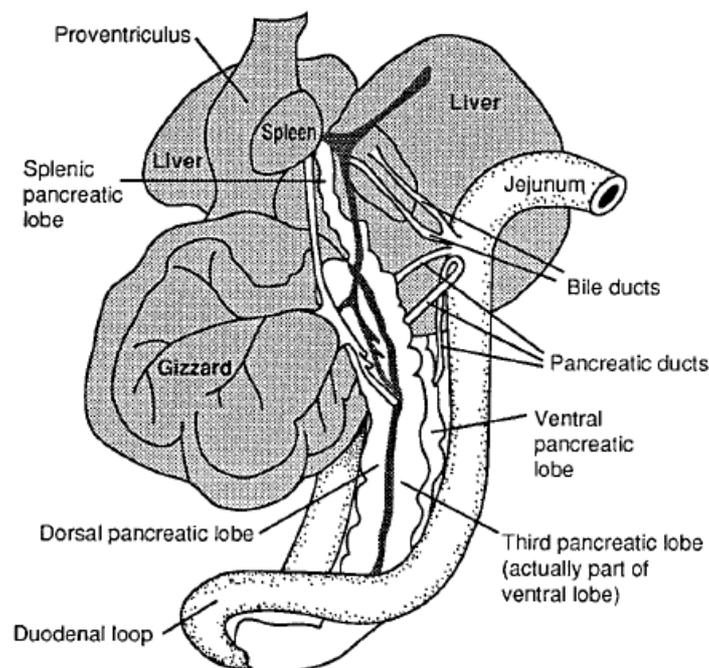


Figura 1: Il pancreas aviare e le sue relazioni anatomiche. Racchiuso nell'ansa duodenale, l'organo si divide nei lobi dorsale, ventrale, splenico e terzo. I dotti pancreatici sfociano nel duodeno ascendente. Da *Sturkie's avian physiology, 5th edition*.

Anatomia microscopica

La porzione esocrina del pancreas rappresenta la maggior parte dell'organo (circa il 99%) ed è costituita da ghiandole tubulo-acinose composte, deputate alla produzione e secrezione di enzimi digestivi e di ioni. Le cellule acinose sono cellule epiteliali di forma cilindrica o piramidale, estremamente polarizzate, con numerosi granuli di zimogeno orientati al polo apicale. I granuli sono assenti nelle cellule centro-acinose, piccoli elementi posti al centro dell'acino cui fanno seguito direttamente i dotti intercalari. Le cellule acinose liberano il proprio secreto nei dotti intercalari, che a loro volta confluiscono in un sistema di dotti a diametro progressivamente maggiore (dotti intra-lobulari, inter-lobulari e dotti pancreatici) fino all'apertura nel lume intestinale. I dotti intercalari sono delineati da epitelio pavimentoso cubico semplice e raggiungono i dotti intra-lobulari costituiti da epitelio colonnare semplice circondato da uno strato di tessuto connettivo, cui si aggiunge esternamente anche un sottile strato muscolare nei dotti inter-lobulari. I dotti pancreatici, infine, constano di tre strati, ossia (i) lo strato mucosale di epitelio colonnare, (ii) lo strato muscolare costituito da una sezione interna di fibre disposte longitudinalmente e una sezione esterna di fibre ordinate circolarmente, e (iii) lo strato avventizio di tessuto connettivo (Gülmez, 2003; Mobini, 2011). Nel tacchino il pancreas non è lobulato per la scarsità del tessuto connettivo inter-lobulare (Mobini e Aghaabedi, 2009).

Le cellule del pancreas endocrino sono presenti sia disseminate singolarmente nell'interstizio del pancreas esocrino sia raggruppate nelle isole di Langerhans, che costituiscono degli aggregati di cellule endocrine di diversa forma e dimensione. Se paragonata ai mammiferi, nelle specie avicole la componente endocrina presenta notevoli differenze nella distribuzione sia delle singole cellule all'interno delle isole sia delle isole tra i lobi. Le tipologie cellulari che si possono riscontrare sono: le cellule α , deputate alla sintesi e rilascio di glucagone, le cellule β , deputate alla produzione di insulina, le cellule δ , deputate alla produzione di somatostatina, e le cellule PP (dette anche F), che secernono il polipeptide pancreatico (Hazelwood, 2000).

Le popolazioni di cellule endocrine sono simili a quelle dei mammiferi, tuttavia differiscono per distribuzione topografica. Caratteristica peculiare del pancreas delle specie aviari, infatti, è la presenza di tipi diversi di isole pancreatiche che a seconda della popolazione cellulare prevalente prendono il nome di isole A o "dark islets", se hanno come popolazione cellulare preponderante le cellule α con la sporadica presenza di qualche δ , e di isole B o "light islets", se sono composte prevalentemente da cellule β in concomitanza a cellule δ . La presenza di isole miste, nelle quali si evidenzia come nei mammiferi la presenza contemporanea dei diversi tipi

cellulari, è stata evidenziata nel pollo ma non nel tacchino (Mobini e Aghaabedi, 2009) né nell'oca (Mobini, 2011).

Le isole A, o “dark”, hanno solitamente maggiori dimensioni e densità cellulare delle isole B. In esse si registra la prevalenza o la sola presenza di cellule α , preposte alla produzione di glucagone, ma spesso si osservano anche cellule δ , mentre le cellule β sono assenti (Gülmez et al., 2004) o segnalate (Mikami e Mutoh, 1971); non è raro riscontrare gruppi di cellule acinose all'interno delle isole stesse. Le isole A non sono distinte in modo netto dal parenchima esocrino e spesso hanno forma irregolare.

Le cellule α all'interno delle isole sono organizzate secondo una disposizione cordonale (Hellerström, 1963) attorno ad una fitta rete di vasi sanguigni e fibre nervose. Queste cellule, di dimensioni maggiori rispetto alle cellule β , hanno forma rotondeggiante o cilindrica e nucleo ovale o rotondo con uno o due nucleoli prominenti; nel citoplasma sono presenti abbondanti granuli di secrezione, acidofili e omogeneamente sferici, spesso orientati al polo vascolare della cellula (Mikami e Mutoh, 1971).

Le isole A presentano una distribuzione caratteristica: per Mikami e Ono esse sono confinate in maniera peculiare nei lobi splenico e terzo (Mikami e Ono, 1962). Altri autori riportano invece che esse si possono riscontrare lungo tutto l'organo (Gülmez et al., 2004), pur ammettendone una presenza maggiore a livello di lobi splenico e terzo e più scarsa nel lobo ventrale. Le isole del lobo splenico sono di dimensioni significativamente maggiori rispetto a quelle degli altri lobi e occupano in proporzione una superficie maggiore del tessuto (Manáková e Titlbach, 2007).

Le isole B, o “light”, sono composte prevalentemente da cellule β secernenti insulina, disposte circolarmente attorno ai capillari al centro dell'isola. Alla periferia, invece, si trovano molte cellule δ e talvolta qualche cellula α . Le isole B sono di forma regolare e tondeggianti e sono separate dal parenchima esocrino in maniera netta grazie ad uno strato di tessuto connettivo.

Le cellule β possono essere di forma rotonda, ovale o poligonale, e di dimensioni piccole. Il nucleo è piccolo e rotondeggiante con uno o due nucleoli prominenti e cromatina diffusa, mentre il citoplasma presenta una fine granulazione, con granuli molto variabili in forma, dimensioni e densità, anche all'interno della stessa cellula, circondati da una matrice densa e omogenea. A volte tali granuli sono polarizzati verso il letto capillare, altre volte sono invece distribuiti più omogeneamente (Mikami e Mutoh, 1971).

Le isole B presentano una distribuzione più uniforme in tutti e quattro i lobi pancreatici, pur con una certa variabilità regionale che vede raggiungere le massime proporzioni nei lobi splenico e terzo (Mikami e Ono, 1962), con dimensioni medie delle isole del lobo splenico – così come già

per le isole A – considerevolmente maggiori rispetto a quelle del resto dell'organo (Hellman e Hellerström, 1960). Oltre che all'interno delle isole, cellule β sono presenti anche come elementi singoli disseminati. Il rapporto numerico tra cellule β e α è di circa 0,4 (Iaglov, 1977). Le cellule δ , preposte alla sintesi di somatostatina, sono di forma rotondeggiante o poligonale. Esse si trovano di frequente come cellule singole disseminate oppure si osservano all'interno delle isole A, nell'interstizio tra le cellule α , e soprattutto in associazione alle isole B, dove sono collocate alla periferia (Rawdon e Andrew, 1979). Le cellule δ nel pancreas sono più comuni delle α e delle β .

Infine, le cellule PP (o F) si trovano soprattutto sparse singolarmente nel tessuto esocrino, in particolare nei lobi dorsale e ventrale, ma occasionalmente si trovano anche associate alle isole A o B (Rawdon e Andrew, 1979). Esse producono il polipeptide pancreatico (PP).

1.1.2 FISILOGIA

Il pancreas è una ghiandola a funzione esocrina ed endocrina: da un lato fornisce succhi digestivi per il completamento intestinale dei processi digestivi iniziati negli stomaci, dall'altro, tramite la produzione di ormoni nelle isole di Langerhans, svolge un ruolo di primaria importanza nel controllo del metabolismo, soprattutto del glucosio.

Pancreas esocrino

Il pancreas funge da ghiandola accessoria dell'apparato digerente secernendo enzimi digestivi a livello di duodeno ascendente. Le secrezioni pancreatiche sono costituite da una fase acquosa, contenente acqua, bicarbonato e ioni, e una fase organica, ricca di enzimi digestivi. Il pH medio è 6,4-6,8 nel pollo e 7,4-7,8 nel tacchino (Denbow, 2000) similmente ai mammiferi domestici dove varia dai 7,1 del cane agli 8,4 del bovino (Beghelli, 1998).

La secrezione pancreatico è indotta da un insieme di stimoli: la fase cefalica influisce per via nervosa per aumentata attività delle fibre vagali, la fase gastrica opera grazie alla distensione meccanica del proventriglio e alla secrezione di gastrina e la fase intestinale è mediata da un meccanismo umorale con produzione di colecistochinina (CCK) e secretina. Quando il chimo raggiunge il duodeno le secrezioni pancreatiche aumentano notevolmente. Alcuni mediatori stimolano preferenzialmente la produzione di fase acquosa del succo pancreatico favorendo un secreto voluminoso e abbondante in acqua e ioni HCO_3^- con effetto tampone sul pH intestinale: tra questi ci sono la secretina, prodotta in sede intestinale, e il VIP (*Vasoactive Intestinal*

Peptide), peptide sintetizzato in sede duodenale (Dockray, 1973). La concentrazione di enzimi nel secreto pancreatico, viceversa, aumenta sotto l'influenza della gastrina, sintetizzata soprattutto nello stomaco ma anche nel duodeno, e della colecistochinina (CCK), polipeptide sintetizzato in sede intestinale in risposta alla presenza di peptidi e lipidi (Beghelli, 1998). Nel tacchino la fase gastrica e gli stimoli vagali rivestono maggiore importanza nel controllo della secrezione rispetto ai mammiferi, dove fase intestinale e secretina sono preminenti (Satoh et al., 1995).

La digestione dei carboidrati e della fibra avviene nel piccolo intestino. Gli enzimi pancreatici rivestono un ruolo importante nel processo poiché forniscono substrati di dimensioni più piccole per l'attacco enzimatico da parte degli agenti intestinali, così, successivamente, nutrienti semplici possono essere assorbiti a livello di duodeno e digiuno. Il glucosio è trasportato all'interno degli enterociti o tramite diffusione passiva o tramite trasporto attivo mediato da *carrier* (Pollock, 2002).

I principali enzimi pancreatici deputati alla digestione delle macromolecole appartengono ai gruppi delle proteasi, delle amilasi e delle lipasi. Trisipina, chimotripsina e elastasi sono enzimi proteolitici che si comportano da endopeptidasi, cioè scindono i legami peptidici all'interno della catena polipeptidica. La tripsina preferibilmente idrolizza i legami peptidici stabilizzanti gli amminoacidi basici, mentre le chimotripsine (A, B e C) agiscono soprattutto sugli amminoacidi aromatici e l'elastasi ha un bersaglio d'azione più ampio scindendo vari amminoacidi alifatici. Le carbossipeptidasi (A e B) agiscono da esopeptidasi causando il rilascio degli amminoacidi all'estremità delle catene polipeptidiche. Le proteasi pancreatiche sono sintetizzate e secrete come pro-molecole inattive per proteggere il pancreas stesso dalla loro potente azione digestiva. Solo in sede intestinale il tripsinogeno viene attivato in tripsina dalle enteropeptidasi prodotte dagli enterociti duodenali e la tripsina stessa provvede all'attivazione sia degli altri enzimi proteolitici sia, per processo autocatalitico, di altro tripsinogeno. Il pancreas produce anche un inibitore della tripsina ad ulteriore protezione della ghiandola. L'amilasi pancreatica viene invece secreta in forma attiva ed agisce scomponendo i polisaccaridi, come l'amido, in disaccaridi tramite l'idrolisi dei legami α -1,4-glicosidici. La lipasi, anch'essa secreta in forma attiva, degrada i trigliceridi in glicerolo e acidi grassi e la fosfolipasi idrolizza i legami esterei dei fosfolipidi. Sono presenti, inoltre, ribonucleasi e desossiribonucleasi per la digestione degli acidi nucleici e anche aminopeptidasi e collagenasi (Beghelli, 1998).

Nel broiler (pollo da carne) tra gli enzimi digestivi l'amilasi costituisce il 28,9%, il tripsinogeno circa il 10% e i tre chimotripsinogeni il 20% (Pubols, 1991). La ripartizione degli enzimi

all'interno del succo pancreatico può essere bilanciata in adattamento al contenuto della dieta, inteso come una modificazione nel breve termine (Hulan e Bird, 1972) o come un adattamento evolutivo su base genetica (Brzęk et al., 2013). Il tasso di secrezione pancreatica negli uccelli è maggiore rispetto ai mammiferi e corrisponde a 0,7 ml/kg/hr nel pollo rispetto a 0,1-0,3 nel cane dopo 24 ore di digiuno (Kokue e Hayama, 1972).

Pancreas endocrino

Gli ormoni pancreatici rivestono un ruolo fondamentale nella regolazione del metabolismo dei carboidrati, che risponde a controlli di tipo meccanico, neurale e ormonale. Gli uccelli presentano un metabolismo più elevato dei mammiferi: il metabolismo del glucosio a digiuno si aggira intorno ai 10-13 mg/kg/min (Hazelwood, 2000) ed è circa il doppio di quello dei mammiferi.

Le concentrazioni ematiche di glucosio a digiuno negli uccelli si aggirano intorno ai 200 mg/ml (11mM) con un range che può variare da 180 a 240 mg/ml (glicemia a digiuno e glicemia postprandiale) (Rideau, 1998), ma possono anche raggiungere i 350 mg/ml (Pilny, 2008), mentre la glicemia media dei mammiferi si aggira sui 100 mg/ml (5,5 mM) con un range che varia tra 75-125 mg/ml. Gli uccelli, pertanto, vivono con livelli di glucosio ematico che nei mammiferi corrisponderebbero ad uno stato di diabete, ma convivono con questa iperglicemia senza manifestare sintomi clinici. Questa capacità degli uccelli di tollerare maggiori quantità di glucosio nel sangue potrebbe essere dovuta al diverso ambiente metabolico in cui si accresce l'embrione (protetto da uovo e sacco vitellino) (Hazelwood, 2000) e/o al ruolo dominante che svolge il glucagone rispetto all'insulina nell'omeostasi del glucosio negli uccelli (Hazelwood, 1984).

Insulina, glucagone, somatostatina e polipeptide pancreatico sono sintetizzati dal reticolo endoplasmatico rugoso come pro-ormoni non ancora biologicamente attivi. Nell'apparato del Golgi hanno luogo cambiamenti conformazionali grazie ai quali molecole più piccole e più attive vengono incorporate in granuli di secrezione pronti alla fusione con la membrana cellulare per l'estruzione del loro contenuto nel liquido extracellulare tramite esocitosi.

L'insulina negli uccelli è un ormone ad azione anabolica, più potente degli equivalenti ormoni dei mammiferi nel provocare ipoglicemia, glicogenosintesi e lipogenesi. Viene sintetizzata nelle cellule β come pre-pro-ormone e poi ridimensionata a pro-insulina (84 amminoacidi) ed è biologicamente attiva solo quando si trova sotto forma di ormone composto da due catene peptidiche, la catena A (20 amminoacidi) e la catena B (31 amminoacidi), unite da due ponti

disolfuro per un totale di 51 amminoacidi. Le strutture dell'insulina di pollo e di tacchino sono identiche (Hazelwood, 2000). Una volta rilasciato, l'ormone si lega con il recettore tirosinchinasico transmembrana la cui autofosforilazione attiva, nei mammiferi, la via metabolica in grado di reclutare i trasportatori di membrana del glucosio responsivi all'insulina, i GLUT-4, altrimenti sequestrati nel citoplasma di adipociti e di miociti scheletrici e cardiaci, consentendo la captazione del glucosio dall'interstizio al liquido intracellulare. Braun e Sweazea riportano che negli uccelli, invece, prevalgono isoforme diverse del trasportatore GLUT mentre la GLUT-4 non è espressa né nel muscolo cardiaco né nel tessuto adiposo e non compare nemmeno nel genoma del pollo (Braun e Sweazea, 2008).

L'insulina ha effetto ipoglicemizzante, aumenta il trasferimento di glucosio all'interno delle cellule nei tessuti muscolari e adiposi, aumenta la sintesi di proteine e di glicogeno nel muscolo e nel fegato e innalza i potenziali di membrana; negli uccelli essa è antigliconeogenetica ma non antilipolitica (lo è comunque l'APP) (Hazelwood, 2000).

I livelli plasmatici di insulina sono di 3-4 ng/ml nell'anatra e nel pollo e subiscono soltanto lievi variazioni in seguito a breve digiuno (Hazelwood, 2000). Il glucosio stimola il rilascio di insulina, ma negli uccelli non è l'agente principale dal momento che, a differenza dei mammiferi dove costituisce il fattore di rilascio più importante, la soglia di sensibilità ad esso è piuttosto elevata per le cellule β (King e Hazelwood, 1976). La risposta fisiologica delle cellule β a livelli stimolatori di glucosio è un rilascio bifasico di insulina con un veloce raggiungimento di un primo picco 5 minuti dopo la stimolazione seguito, dopo un brusco abbassamento, da un secondo innalzamento più graduale, che persiste tanto quanto la sollecitazione indotta dal glucosio (Rideau, 1998); tuttavia nelle specie aviari sono richiesti valori molto alti di glucosio per provocare un rilascio modesto di insulina (*in vitro* 500-700 mg/dl contro i 150-200 mg/dl sufficienti ai mammiferi) (Naber e Hazelwood, 1977) e non sempre tale schema è rispettato. Il glucosio, comunque, può agire in sinergia con gli amminoacidi nello stimolare il rilascio di insulina.

Le cellule β sono maggiormente sensibili nei confronti di colecistochinina, glucagone e amminoacidi assorbiti (Naber e Hazelwood, 1977; Laurent e Mialhe, 1978; Pollock, 2002). Inoltre è attiva una modulazione paracrina, con le cellule β stimulate dalle α e inibite dalle δ , in un sistema a feedback negativo a breve raggio (Hazelwood, 2000). Adrenalina, secretina e acidi grassi negli uccelli non suscitano effetto sul rilascio di insulina (Pilny, 2008).

Il glucagone è un potente ormone catabolico. È un polipeptide lineare biologicamente attivo nella sua struttura composta di 29 amminoacidi, prodotto finale conseguito al pre-pro-glucagone (179 amminoacidi) e al pro-glucagone (96-100 amminoacidi). Il glucagone degli

uccelli differisce da quello dei mammiferi, invariante all'interno della classe, per la sostituzione di un amminoacido (due nell'anatra) (Hazelwood, 2000).

Le sue concentrazioni plasmatiche – in pollo, anatra, piccione, oca – sono di circa 2-4 ng/ml (rispetto ai 0,05-0,10 ng/ml dei mammiferi) e aumentano del 100-200% in seguito a breve digiuno. Il legame dell'ormone al recettore di membrana accoppiato a proteine G provoca un aumento di AMP ciclico (cAMP) con l'attivazione della cascata fosforilativa che conduce ai suoi effetti biologici: il glucagone a livello epatico e muscolare favorisce la glicogenolisi e la gluconeogenesi grazie all'attivazione degli enzimi preposti, aumentando la glicemia, mentre nel tessuto adiposo esercita un'azione lipolitica (Hazelwood, 2000).

Il rilascio di glucagone dalle cellule α è stimolato dalla colecistochinina e dall'insulina e fortemente inibito dal glucosio (Ruffier et al., 1998) e dalla somatostatina; l'effetto degli acidi grassi liberi è riportato essere sia stimolatorio (Colca e Hazelwood, 1981; Hazelwood 2000) sia inibitorio (Laurent e Mialhe, 1978; Gross e Mialhe, 1986), forse in dipendenza di caratteristiche intrinseche degli stessi acidi grassi (Hong et al., 2005).

Negli uccelli è il glucagone a rivestire il ruolo chiave nella regolazione del metabolismo del glucosio, diversamente dai mammiferi dove tale compito è rivestito dall'insulina. Questo è imputabile al fatto che le specie aviari presentano un tasso di metabolismo glucidico così elevato da richiedere un supporto energetico costante, indipendentemente dall'attività svolta. In particolare, come riportato da Pollock, negli uccelli granivori la sinergia tra alto tasso metabolico e scarse riserve di glicogeno porta all'insorgenza precoce dello stimolo per la gluconeogenesi dopo un digiuno anche breve, tanto che a livello pancreatico prevalgono le cellule glucagone secernenti (Pollock, 2002). Nell'organismo negli stati postprandiali prevalgono le reazioni anaboliche con lo stoccaggio di energie per le necessità future, mentre negli stati di digiuno, anche brevi, dominano quelle cataboliche finalizzate all'utilizzo dei substrati endogeni, regolate appunto principalmente dal glucagone. Negli uccelli carnivori il processo di gluconeogenesi è continuo sia negli stati postprandiali sia a digiuno grazie agli amminoacidi provenienti dalla dieta o dalle riserve muscolari, con il mantenimento di valori glicemici piuttosto costanti.

Come afferma Hazelwood «il glucagone negli uccelli è molto importante per la corretta glicoregolazione, ma l'insulina è necessaria per la completa normalità» (Hazelwood, 2000). Nel valutare i meccanismi di omeostasi del glucosio è dunque più opportuno considerare il sinergismo di insulina e glucagone tramite il loro rapporto molare anziché i due ormoni separatamente: il rapporto molare insulina/glucagone (I/G) negli uccelli (pollo, anatra, oca, piccione) costituisce meno della metà del normale rapporto postprandiale dei mammiferi (circa

2,5-3,5 nei primati) (Hazelwood, 2000). Questo indica che negli uccelli l'equilibrio è sbilanciato a favore delle reazioni cataboliche, equivalente a condizioni che nei mammiferi corrisponderebbero a stati di diabete mellito, digiuno o esercizio (Hazelwood, 1984). Ciò rende disponibili grandi quantità di energia per sostenere un tasso di metabolismo elevato e stati di stress fisiopatologico quali l'ovodeposizione, il volo migratorio e il digiuno prolungato.

La modulazione del rapporto molare di insulina e glucagone è prevalentemente a carico della somatostatina. All'interno del pancreas endocrino, infatti, avvengono interazioni tra le diverse popolazioni cellulari grazie a meccanismi di modulazione paracrina, possibili per la condivisione del fluido interstiziale all'interno dell'isola stessa (Hazelwood e Langslow, 1978). Le cellule α stimolano le cellule β e le δ , mentre le δ provocano un'inibizione di tutte le altre cui sono più sensibili le α e meno le PP (Hazelwood, 2000).

La somatostatina – denominata anche con la sigla SRIF (*Somatotropin Release-Inhibiting Factor*) – è un peptide di 14 amminoacidi stabilizzati da ponti disolfuro. Il pancreas degli uccelli contiene una quantità di somatostatina maggiore rispetto ai mammiferi (Weir et al., 1976), da 20 (nel pollo) a 300 volte (nel piccione), così come le concentrazioni plasmatiche sono superiori del 200-400%. La somatostatina esercita uno stimolo inibitorio su tutti gli ormoni pancreatici, in particolare sul glucagone: in questo modo equilibra il rapporto molare I/G fornendo al flusso venoso portale la giusta combinazione ormonale per sopperire alle richieste metaboliche del momento. L'azione inibitoria si estende, oltre a insulina e glucagone, anche a GH, gastrina, secretina, ACTH, prolattina e TSH. Le funzioni della somatostatina sono quindi di sopprimere il rilascio di ormoni pancreatici, modulare il rapporto molare I/G e rallentare l'assorbimento intestinale di nutrienti (Hazelwood, 2000).

Il polipeptide pancreatico aviare (APP) viene sintetizzato dalle cellule PP (F) del pancreas, stimulate da peptidi intestinali quali colecistochinina, secretina, gastrina e amminoacidi assorbiti. L'APP nella sua forma attiva è formato da 36 amminoacidi. Le concentrazioni plasmatiche dell'ormone raggiungono livelli 20-40 volte maggiori che nell'uomo, con concentrazione postprandiale nel pollo sui 6-8 ng/ml. L'APP inibisce la motilità e le secrezioni intestinali, inibisce l'attività del pancreas esocrino e le secrezioni della cistifellea, stimola la glicogenolisi ma non l'iperglicemia, ha effetto antilipolitico e induce senso di sazietà (Hazelwood, 2000).

1.1.3 PATOLOGIA

Le patologie che colpiscono il pancreas possono coinvolgere la componente esocrina, quella endocrina o entrambe ed essere parte di processi infettivi, non infettivi e proliferativi (Schmidt e Reavill, 2014). Le segnalazioni di patologie pancreatiche negli uccelli sono poco frequenti in letteratura e spesso limitate alle specie da compagnia.

Il diabete mellito è una patologia metabolica in cui la disponibilità di insulina per l'organismo è ridotta. Nei mammiferi ciò può essere imputato alla degenerazione delle cellule β , alla loro distruzione immunomediata o alla formazione di anticorpi anti-insulina, inoltre può essere conseguenza di concentrazioni aumentate di glucagone, atrofia pancreatica idiopatica e di pancreatite acuta necrotizzante (La Perle e Capen, 2006). Si distinguono due forme di diabete mellito: il diabete di tipo 1 insulino-dipendente (IDDM), con infiammazione e distruzione immunomediata delle isole di Langerhans, diffuso nell'uomo, nei roditori da laboratorio e talvolta presente nel cane, e il diabete di tipo 2 non insulino-dipendente (NIDDM), caratterizzato da alterata risposta cellulare all'insulina, associato a condizioni sottostanti quali obesità, iperadrenocorticismo, aumentata concentrazione di ormoni insulino-antagonisti (Rae, 1995) e molto spesso, nell'uomo e nel gatto, a fenomeni di amiloidosi delle isole pancreatiche per deposizione di IAPP (*Islet Amyloid Polypeptide*), evento non riportato negli uccelli. Istologicamente è possibile notare diminuzione del numero e delle dimensioni delle isole pancreatiche, con cellule β meno numerose e con citoplasma vacuolizzato (degenerazione idropica). Quando la patogenesi è autoimmune si può rilevare la presenza di infiltrato linfoplasmacellulare, mentre in alcune forme di diabete di tipo 2 si osserva la deposizione di matrice amiloide (La Perle e Capen, 2006).

Il diabete mellito negli uccelli è stato riportato in conseguenza a pancreatectomia chirurgica, infusione sperimentale di anticorpi anti-insulina, neoplasie e infiammazioni del pancreas (Rae, 1995). La diagnosi di diabete mellito è spesso stata questione dibattuta a causa della mancanza di conoscenze sulla patogenesi della malattia nei volatili, principalmente per differenze nel metabolismo del glucosio rispetto ai mammiferi, considerato il fisiologico status di iperglicemia e la controversa rilevanza del ruolo dell'insulina in queste specie. Casi di iperglicemia possono essere spesso stati attribuiti a malattie estranee al pancreas per la difficoltà a diagnosticare forme di diabete mellito primario a causa dell'ipotesi che la causa del diabete in questi animali non sia da ricercare nella carenza di insulina ma altrove (Pilny, 2008). Studi sperimentali hanno mostrato da un lato che la rimozione chirurgica sperimentale del pancreas conduce a gravi crisi ipoglicemiche che richiedono somministrazioni continue di glucagone o glucosio per il

mantenimento in vita e dall'altro che la somministrazione di anticorpi anti-insulina porta a iperglicemia grave, suggerendo quindi l'importanza non esclusiva dei due ormoni (Hazelwood, 2000). Inoltre è possibile sussistano anche differenze di specie, considerando ad esempio che la pancreatectomia parziale porta ad uno stato di diabete transiente nell'anatra (Laurent e Mialhe, 1978) ma permanente nell'oca (Karmann e Mialhe, 1976).

Il diabete mellito è diagnosticato soprattutto in uccelli da compagnia, in larga parte Psittaciformi. Tra i casi riportati in letteratura vi sono tucano toco (*Ramphastos toco*) (Douglass, 1981), pappagallo cenerino (*Psittacus erithacus*) (Candeletta et al., 1993), parrocchetto nanday (*Nandayus nenday*) (Desmarchelier e Langlois, 2008), ara frontecastana (*Ara severa*) e ara militare (*Ara militaris*) (Pilny e Luong, 2005; Gancz et al., 2007), poiana della Giamaica (*Buteo jamaicensis*) (Wallner-Pendleton et al., 1993), calopsite (*Nymphicus hollandicus*) (Phalen et al., 2007). Il sospetto di diabete mellito si basa soprattutto sulla presenza di sintomi clinici mentre la biopsia pancreatica è un'evenienza rara.

Il diabete mellito è stato descritto istologicamente nel caso di un rapace (poiana della Giamaica) che presentava una forma di diabete primario con degenerazione delle sole cellule β con vacuolizzazioni citoplasmatiche (Wallner-Pendleton et al., 1993) e nel caso di una calopsite con pancreatite da Herpesvirus che mostrava infiltrato linfoplasmacellulare nel tessuto esocrino e assenza di isole visibili (Phalen et al., 2007).

Gli animali diabetici presentano poliuria, polidipsia, perdita di peso e polifagia. La diagnosi si basa sulla presenza di valori di glicemia superiori al range fisiologico di 180-350 mg/dl (ma i valori di riferimento sono molto variabili tra le singole specie) in maniera permanente, poiché anche condizioni di stress possono concorrere ad un rialzo temporaneo della glicemia. Tali livelli di glucosio ematico, superando la soglia di riassorbimento renale, determinano la comparsa di glicosuria; talvolta insorge anche chetonuria (Pilny, 2008).

Sintomi di diabete mellito possono potenzialmente risultare anche da patologie del pancreas di tipo infiammatorio. Le malattie che colpiscono il pancreas, tra cui quelle batteriche e virali, possono avere come target sia il pancreas esocrino sia quella endocrino o solo la porzione esocrina.

La pancreatite è il processo di infiammazione, acuto o cronico, del pancreas. I possibili sintomi clinici di animali affetti da pancreatite comprendono dolore addominale (con animali che cadono dal trespolo, si beccano l'addome e le penne, mostrano comportamenti insoliti), disturbi gastrointestinali quali vomito, diarrea o ileo, anoressia e perdita di peso (Doneley, 2001).

L'eziopatogenesi della pancreatite non è stata ancora completamente definita ma di certo coinvolge l'inappropriata attivazione precoce di proenzimi pancreatici all'interno dell'organo

stesso in risposta a aumentata auto-attivazione o ridotta autolisi. La tripsina attivata è così rilasciata nel liquido extracellulare e a sua volta concorre all'ulteriore rilascio di altri enzimi digestivi, determinando autodigestione delle cellule pancreatiche, infiammazione intensa e spesso necrosi del grasso peripancreatico (Watson, 2005). Nella patogenesi dell'infiammazione concorrono fattori genetici ed ambientali: nell'uomo fattori predisponenti sono i calcoli biliari, il fumo, l'alcool, l'obesità, il diabete mellito, alcuni farmaci, alcune malattie autoimmuni e la predisposizione genetica (Yadav e Lowenfels, 2013), mentre nel cane e nel gatto prevale la forma idiopatica (90%), con i casi rimanenti determinati da fattori di rischio come ostruzioni del dotto pancreatico, dieta iperlipidica, traumi, ischemia e danno da riperfusione, ipercalcemia, farmaci e tossine, infezioni come la toxoplasmosi (Watson, 2005).

Negli uccelli la causa scatenante la pancreatite è spesso difficile da identificare. Come riportato da Doneley, può essere riconducibile a cause dietetiche quali regimi alimentari ricchi in grassi, tossicità (in primis quella da zinco), traumi, infezioni batteriche e virali, neoplasie (Doneley, 2001). Le infezioni batteriche del pancreas possono coinvolgere esclusivamente quest'organo, derivare da patologie sistemiche o estendersi da peritoniti; sono state descritte spesso forme in associazione a *Chlamydophila psittaci* (Mirandé et al., 1992). I virus che sono stati segnalati in associazione a pancreatite comprendono il virus della West Nile (Palmieri et al., 2011), l'Herpesvirus (Phalen et al., 2007), i virus influenzali di tipo A (Shinya et al., 1995), Reovirus e Adenovirus (Lenz et al., 1998), il virus della malattia di Newcastle (Nakamura et al., 2008), Coronavirus (Qian et al., 2006) e il Paramyxovirus sierotipo 3 (Jung et al., 2009). Il pancreas è uno degli organi maggiormente colpiti in un'infezione da virus influenzale di tipo A ad alta patogenicità (HPAI) (Teifke et al., 2007) ma può essere interessato dall'infezione anche da parte di virus a bassa patogenicità (LPAI) (Okamoto et al., 2007).

Lesioni pancreatiche in corso di influenza aviare

Il pancreas è uno degli organi principalmente colpiti in caso d'infezione con virus influenzali ad alta patogenicità (HPAI). Macroscopicamente l'organo presenta sulla superficie aree multifocali di scolorimento, dovute alla necrosi sottostante, e di emorragia (Figura 2a). Gli antigeni virali sono presenti all'interno dei nuclei e del citoplasma delle cellule infette, particolarmente ai margini delle aree di necrosi, e anche nelle cellule endoteliali dei vasi (Teifke et al., 2007; Bröjer et al., 2009; van Riel et al., 2009). A livello istologico (Figura 2b) si osserva necrosi degli acini da multifocale a coalescente grave, degenerazione vacuolare delle cellule acinose (Acland et al., 1984; Nili et al., 2008), edema moderato, infiltrato infiammatorio misto nella

porzione esocrina ed emorragie (Teifke et al., 2007; Bröjer et al., 2009; van Riel et al., 2009). Il tacchino presenta lesioni pancreatiche più gravi se paragonato ad altre specie come il pollo, la quaglia, la faraona, il fagiano e la pernice (Perkins e Swayne, 2001).

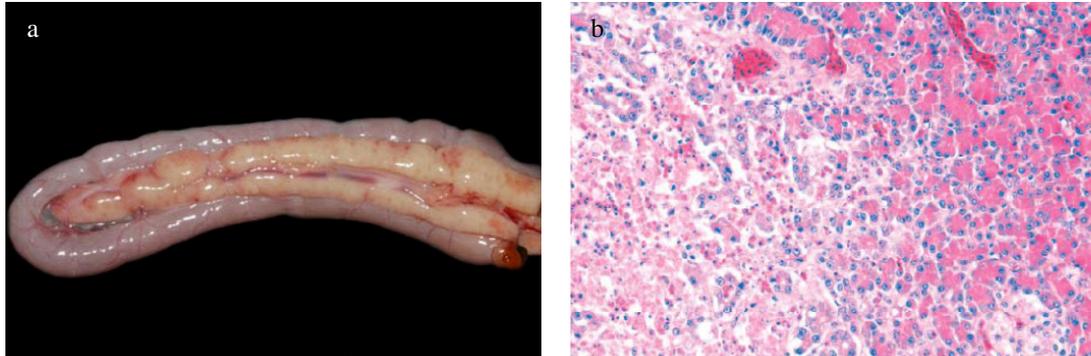


Figura 2: Lesioni pancreatiche da infezione con virus HPAI. a, Lesioni macroscopiche: organo gonfio con foci emorragici da multifocali a coalescenti; pollo, 5 dpi (da *Atlas of avian diseases*, Cornell University, partnersah.vet.cornell.edu/avian-atlas). b, Lesioni microscopiche: area necrotica con perdita dei nuclei e del dettaglio cellulare circondata da cellule acinose; pollo, H&E, 20X (da van Riel et al., 2009).

La replicazione dei virus a bassa patogenicità (LPAI) avviene a livello locale (negli apparati respiratorio e gastroenterico). È stato anche segnalato il coinvolgimento pancreatico nel corso di alcuni disegni sperimentali e di alcune infezioni naturali. L'infezione sperimentale di alcuni pulcini con virus LPAI ha causato prima necrosi degli acini pancreatici e infiammazione eterofilica e macrofagica, poi gradualmente infiammazione linfocitica, proliferazione dutturale e fibrosi (Shinya et al., 1995). Inoltre, il coinvolgimento pancreatico è stato uno dei tratti distintivi durante le epidemie in Italia di H7N1 (1999-2001) e H7N3 (2002-2004), in maniera molto più evidente nel tacchino che nel pollo. Le lesioni pancreatiche qui costituiscono il reperto anatomopatologico più cospicuo: l'organo è indurito ed emorragico con necrosi focale degli acini e infiammazione. La nucleoproteina del virus influenzale è presente nell'epitelio acinoso necrotico (Capua et al., 2000; Cattoli et al., 2003).

1.2 L'INFLUENZA AVIARE

1.2.1 EZIOLOGIA E BASI DELLA PATOGENICITÀ

L'influenza aviare è una malattia dovuta dall'infezione da virus influenzali di tipo A. Gli agenti appartengono alla famiglia *Orthomyxoviridae*, cui fanno capo i generi *Influenzavirus A*, *B*, e *C*, *Thogotovirus* e *Isavirus*: sono collocati nel genere *Influenzavirus A* sulla base delle caratteristiche strutturali degli antigeni profondi NP (nucleoproteina) e M (proteina di matrice)

(Alexander, 2008). I virus influenzali di tipo A sono classificati in sottotipi a seconda delle glicoproteine di superficie HA, emoagglutinina, e NA, neuraminidasi, che presentano (Lee e Saif, 2009). Ogni ceppo virale è definito secondo una nomenclatura standardizzata definita da sei elementi: (i) la sigla del tipo determinato dall'antigene profondo (qui "A"), (ii) la specie da cui è stato originariamente isolato il virus (omesso se è l'uomo), (iii) l'indicazione geografica del luogo di origine, (iv) il numero del ceppo, (v) l'anno d'isolamento e (vi) il sottotipo antigenico dato da HA e NA, spesso tra parentesi (Swayne, 2008a). Un esempio è A/turkey/Italy/3675/1999 (H7N1). I virus influenzali di tipo A sono stati isolati in diverse specie quali uomo, cavallo e suino e in un'ampia varietà di volatili domestici e selvatici. Tutti i virus influenzali aviari sono classificati come tipo A (Lee e Saif, 2009).

Il virus influenzale ha genoma a RNA a singolo filamento a polarità negativa diviso in otto segmenti che codificano per dieci proteine, otto delle quali strutturali e due non strutturali (Alexander, 2008). I virioni sono dotati di *envelope* e sono pleomorfi, con forma variabile tra sferica (particelle di 80-120 nm) o filamentosa (particelle di diversi micron) (Figura 3) (Swayne, 2008a). Le proteine strutturali del virione maturo possono essere divise in proteine di superficie, che includono l'emoagglutinina HA, la neuraminidasi NA e i canali ionici di membrana M2, e proteine profonde, che comprendono le nucleoproteine NP, le proteine di matrice M1 e il complesso delle polimerasi con PB1 (polimerasi basica 1), PB2 (polimerasi basica 2) e PA (polimerasi acida). Infine esistono le proteine non strutturali NS1 e NS2 (quest'ultima conosciuta anche come NEP *Nuclear Export Protein*) (Swayne, 2008a).

I geni che codificano per HA e NA sono i meno conservati tra le specie perciò si possono distinguere 16 sottotipi di HA (H1-H16) e 9 di NA (N1-N9) (Fouchier et al., 2005). HA e NA sono glicoproteine, rispettivamente trimeri a forma di *spikes* e tetrameri di aspetto globulare, presenti come proiezioni superficiali sull'*envelope*. Le proteine di superficie sono gli elementi principali contro cui è diretto il riconoscimento degli anticorpi neutralizzanti nell'immunità dell'ospite (Lee e Saif, 2009). Le proteine HA e NA rivestono un ruolo fondamentale nel processo d'infezione della cellula ospite. La proteina HA media il legame del virus all'acido sialico (zucchero terminale alle estremità N- e O- delle glicoproteine) dei recettori di superficie della cellula ospite e, dopo l'endocitosi, media la fusione dell'*envelope* virale con la membrana dell'endosoma. La NA riveste ruolo di enzima nella liberazione dei virioni appena sintetizzati (Lee e Saif, 2009). La proteina M2 agisce come canale ionico con ruolo nell'*uncoating* del virus.

Tra le proteine profonde, le tre polimerasi (PB2, PB1, PA) formano il complesso ribonucleoproteico RNP, unità funzionale minima di replicazione responsabile della

trascrizione degli RNA messaggeri (mRNA), della sintesi dell'antigenoma complementare (cRNA) e della trascrizione in RNA virale (vRNA). La proteina di matrice M1 fa da ponte tra l'*envelope* e le strutture profonde e ha ruolo nell'assemblaggio del virus. La proteina NS2 o NEP è sempre stata ritenuta non strutturale ma in verità si rileva sia nella cellula ospite sia nella particella virale e fa da mediatore nell'esportazione di RNP di nuova sintesi dal nucleo. La proteina NS1 è l'unica veramente non strutturale, essendo rintracciabile nelle cellule dell'ospite ma non nel virione; regola lo *splicing* e la traduzione di mRNA e aiuta a competere contro le difese dell'ospite (Swayne, 2008a; Lee e Saif, 2009).

In accordo alla definizione dell'OIE per «influenza aviare» si intende *un'infezione del pollame causata da ogni virus influenzale di tipo A dei sottotipi H5 o H7 oppure da ogni virus influenzale di tipo A avente indice di patogenicità intravenosa (IVPI) maggiore di 1,2 (o in alternativa una mortalità di almeno il 75%)* (OIE - World organization for animal health, 2013) (Direttiva 2005/94/CE, 2006).

I virus influenzali possono essere ulteriormente classificati in due patotipi: i virus ad alta patogenicità (HPAI, *High Pathogenic Avian Influenza*) e quelli a bassa patogenicità (LPAI, *Low Pathogenic Avian Influenza*). I virus HPAI hanno IVPI maggiore di 1,2 in polli di 6 settimane o in alternativa causano una mortalità di almeno il 75% in polli di 4-8 settimane infettati per via intravenosa. Gli H5 e H7 che non rientrano in tali parametri vanno sequenziati per determinare se esistono amminoacidi basici multipli al sito di *cleavage* (HA₀) dell'emoagglutinina, perché in caso di sequenza amminoacidica simile agli HPAI anch'essi rientrano nella categoria HPAI. I LPAI sono i virus influenzali di tipo A dei sottotipi H5 e H7 che non sono HPAI (OIE - World organization for animal health, 2013).

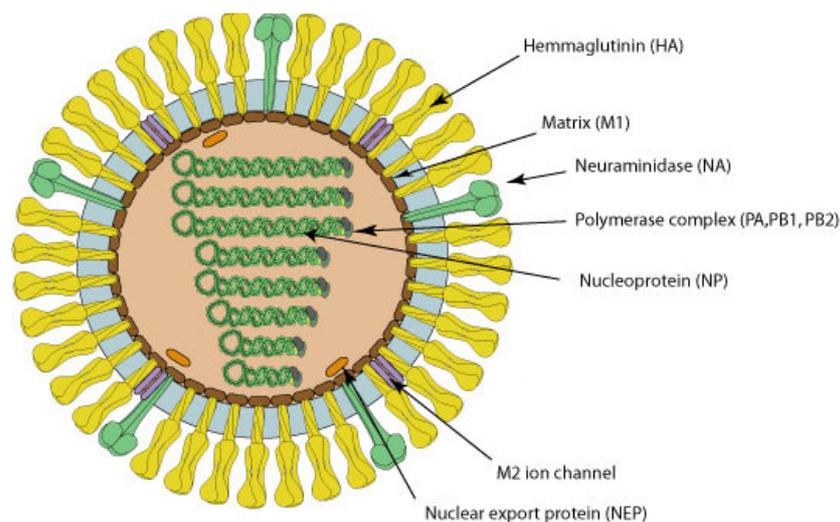


Figura 3: Struttura di Influenzavirus A. Da ViralZone (www.expasy.org/viralzone), Swiss Institute of Bioinformatics

La differenza tra virus LPAI e HPAI è che la replicazione avviene in maniera rispettivamente locale e sistemica. La principale base molecolare della patogenicità e del tropismo del virus risiede nel sito di *cleavage* della proteina HA: perché il virus possa infettare e diffondersi, infatti, è essenziale l'attivazione del precursore HA₀ in HA₁ e HA₂ ad opera di enzimi proteolitici dell'ospite. Il precursore nei virus LPAI possiede una singola arginina nel sito di *cleavage* e un altro amminoacido basico in posizione -3 o -4 rispetto ad esso. La scissione avviene per l'azione di proteasi dell'ospite in grado di operare in ambiente extracellulare, come tripsina o enzimi tripsina-like, restringendo i siti di replicazione ai tessuti dove esse sono presenti, ossia i tratti respiratorio e intestinale (Alexander, 2007). Nei virus HPAI, invece, il sito di *cleavage* è caratterizzato da una sequenza di amminoacidi basici multipli (arginina e lisina) (Wood et al., 1993) che vengono riconosciuti intracellularmente da endoproteasi ubiquitarie subtilisina-like come la furina. Oltre agli amminoacidi multipli sembra che anche la glicosilazione di aree adiacenti ai siti recettoriali possa influire sulla patogenicità (Perdue et al., 1995). L'attivazione di HA da parte di proteasi ubiquitarie determina quindi la natura sistemica dell'infezione con virus HPAI (Alexander, 2007).

1.2.2 ECOLOGIA ED EPIDEMIOLOGIA

Negli ultimi cinquant'anni sono stati isolati negli uccelli tutti i 16 HA e i 9 NA (Perdue, 2008). Gli ospiti naturali che fungono da *reservoir* dei virus influenzali aviari sono le specie aviari selvatiche, particolarmente gli uccelli di ambiente acquatico. I virus sono stati isolati in un'ampia varietà di volatili il cui elenco è in continuo aggiornamento ma già supera abbondantemente il centinaio (Olsen et al., 2006). I più colpiti sono gli ordini degli *Anseriformes* (circa il 10% dei virus isolati), cui appartengono anatre, oche e cigni, e dei *Charadriiformes* (2-3%), cui fanno capo uccelli di mare come i gabbiani e le sterne (Alexander, 2007; Stallknecht e Brown, 2008). In questi animali i virus LPAI sono mantenuti grazie allo sviluppo di un'infezione asintomatica o al massimo di una malattia lieve, potendo così replicare e diffondere facilmente tra le specie aviari che popolano uno stesso ecosistema. Fino al 2002 erano stati isolati dai volatili selvatici solamente virus influenzali a bassa patogenicità e si riteneva fossero questi i patotipi circolanti. Con l'avvento del virus HPAI H5N1 asiatico, tuttavia, anche tra le specie selvatiche si sono registrati focolai di malattia e alti tassi di mortalità con isolamento di virus HPAI (Stallknecht e Brown, 2008; Bröjer et al., 2009; Ogawa et al., 2009).

La trasmissione dei virus influenzali di solito avviene all'interno della stessa specie, ma può verificarsi anche interspecie soprattutto se è presente un'affinità tassonomica. Dopo la trasmissione, il virus si deve adattare alla nuova specie ospite prima di poter replicare e diffondere in maniera efficiente (Perdue e Swayne, 2005). Si ritiene che alla base dell'infezione del pollame vi sia il contatto con volatili selvatici infetti. Le specie domestiche in condizioni naturali non rientrerebbero nello spettro d'ospite dei virus influenzali, ma plasmare gli ecosistemi tramite la cattività e l'allevamento ha creato nuove nicchie d'infezione (Swayne, 2008b).

L'esposizione del pollame ai virus LPAI veicolati dalle specie selvatiche può avvenire in maniera diretta per il contatto con gli uccelli selvatici, in modo indiretto tramite i vettori meccanici come l'uomo o gli oggetti contaminati, per la presenza del virus nell'aria e nell'acqua. Una volta introdotto nella popolazione, il virus tende ad adattarsi alla nuova specie consentendo la trasmissione tra un soggetto infetto e un soggetto suscettibile all'interno della stessa, fino a diventare specie specifico e a non infettare più la specie d'origine (Perdue, 2008). La trasmissione orizzontale è dovuta all'eliminazione del virus nelle feci e nelle secrezioni respiratorie. La trasmissione verticale è possibile, ma è limitata dal calo o dalla cessazione dell'ovodeposizione e dalla morte dell'embrione in caso di virus HPAI (Swayne, 2008b).

Le specie maggiormente suscettibili all'infezione LPAI sono, in ordine decrescente, il tacchino, l'anatra e il pollo (Spackman et al., 2010). I polli sono più resistenti all'infezione diretta con virus di campo ma più sensibili a virus già adattati ad una specie domestica intermedia (Swayne, 2008b).

Dopo un periodo di circolazione all'interno di popolazioni di pollame domestico, i virus LPAI dei sottotipi H5 e H7 possono mutare a virus HPAI (che non originano come tali nel *reservoir* selvatico): al sito di *cleavage* di HA insorgono mutazioni (duplicazioni spontanee, sostituzioni, inserzioni) risultanti in sequenze di amminoacidi basici multipli, per cause ancora non chiarite. L'insorgenza delle mutazioni non è prevedibile, può avvenire dopo qualche settimana o dopo diversi mesi (Alexander, 2007).

Oltre alle già citate differenze amminoacidiche degli antigeni di superficie HA e NA che portano alla definizione dei diversi sottotipi, i virus influenzali sono dotati di una grande variabilità per l'alto tasso di mutazioni e di riassortimento dei segmenti. La veloce insorgenza di mutazioni avviene frequentemente a causa degli errori di trascrizione dovuti alla mancanza di un meccanismo di *proofreading* in fase di replicazione (Swayne, 2008a). Le mutazioni puntiformi nei geni codificanti per HA e NA portano a cambi antigenici minori che potrebbero influenzare la specificità della risposta anticorpale, con la comparsa di varianti di ceppo in un

fenomeno definito “deriva antigenica” (*antigenic drift*) (Lee e Saif, 2009). Lo “spostamento antigenico” (*antigenic shift*) si ha con il riassortimento di uno o più geni di virus già adattati e la comparsa di nuovi sottotipi virali (Perdue e Swayne, 2005).

I processi di riassortimento genetico e di adattamento a nuovi ospiti costituiscono le basi del potenziale zoonotico dei virus influenzali aviari. I virus influenzali possono infettare un’ampia varietà di specie ospiti, inclusi molti volatili, il suino, il cavallo e l’uomo. Negli ultimi cinquant’anni ci sono state segnalazioni sporadiche d’infezione nell’uomo con virus di origine aviare: tra il 1959 e il 2005 si è trattato di 234 casi, la maggior parte dei quali durante le epidemie HPAI di H5N1 nel Sud Est asiatico (1997-2005) e di H7N7 nei Paesi Bassi (2003) (Perdue e Swayne, 2005); tra il 2003 e marzo 2014 i casi di infezione con H5N1 sono stati 664 di cui 391 mortali (WHO - World Health Organization, 2014). I virus vengono facilmente inattivati con il calore, i detergenti e i disinfettanti (Swayne, 2008b). L’uomo può esporsi a virus influenzali aviari tramite il contatto diretto o indiretto con i tessuti e le secrezioni degli animali infetti. I casi registrati d’infezione derivano tutti da un contatto molto stretto con gli animali malati, vivi o morti, spesso per motivi professionali. In questi episodi non è stata mai dimostrata la trasmissione tra uomo e uomo, suggerendo la difficoltà di adattamento del virus alla popolazione umana. Tuttavia rimane da chiarire quali classi di AIV siano in grado di infettare l’uomo e quale possa essere la loro capacità di generare una pandemia (Perdue e Swayne, 2005).

1.2.3 PATOGENESI

L’infezione avviene per inalazione o per ingestione. Il periodo d’incubazione dei virus HPAI nel pollo varia da poche ore in caso d’infezione sperimentale per via intravenosa a 24 ore per via intranasale fino a 3 giorni in caso di infezione naturale. I virus LPAI replicano negli apparati respiratorio e digerente mentre gli HPAI, in seguito a replicazione primaria in questi tratti, diffondono per via ematogena e linfatica raggiungendo tutti gli organi. L’escrezione del virus avviene con le feci e le secrezioni respiratorie, inizia già prima della comparsa della malattia e può protrarsi anche dopo la risoluzione della sintomatologia, con durata media di 7-10 giorni (Swayne, 2008b).

L’infezione della cellula ospite ha inizio con l’adsorbimento e la penetrazione del virus. Il legame agli acidi sialici presenti nei recettori della cellula ospite è mediato dalla glicoproteina HA. Una volta che il virus è inglobato dall’endosoma, la proteina M2 provoca un’acidificazione dell’ambiente che stimola l’attivazione di HA e HA permette la fusione dell’*envelope* con la

membrana endosomica causando il rilascio di RNA nel citoplasma. Il complesso ribonucleoproteico RNP è trasportato attivamente dal citoplasma nel nucleo grazie al segnale di localizzazione nucleare della nucleoproteina NP. Qui l'RNA a polarità negativa è copiato in mRNA a polarità positiva, trasportato nel citoplasma grazie alla proteina NEP e tradotto in proteine virali dai ribosomi (Swayne, 2008a). La maturazione del virus avviene con il *cleavage* del precursore di HA a livello intracellulare per i virus HPAI ed extracellulare per i virus LPAI. I virioni sono rilasciati per *budding* attraverso la membrana cellulare grazie all'attività enzimatica di NA, con acquisizione dell'envelope.

Il sito in cui inizia la replicazione dei virus LPAI è la cavità nasale, da cui i virioni infettanti sono rilasciati con colonizzazione del tratto respiratorio e intestinale. Di norma le lesioni da LPAI sono limitate a questi due distretti, ma sporadicamente anche virus di questo patotipo possono provocare danni ad organi contenenti cellule epiteliali con enzimi tripsina-like, come tubuli renali e pancreas esocrino. I virus HPAI replicano primariamente nei distretti respiratorio e intestinale, poi invadono la sottomucosa e raggiungono i capillari infettando le cellule endoteliali. Sfruttando i sistemi vascolare e linfatico raggiungono quindi tutti gli organi (visceri, sistema nervoso centrale, cute) dove replicano causando un'insufficienza multi organo ad esito mortale (Swayne e Pantin-Jackwood, 2008).

1.2.4 SINTOMI

L'esito dell'esposizione a virus influenzali aviari può spaziare dallo sviluppo di un'infezione asintomatica ad una sintomatologia clinica lieve fino ad una malattia grave che può portare alla morte (Swayne, 2008b).

I virus LPAI sono dotati di alta morbilità (>50%) e bassa mortalità (<5%, può aumentare però in caso di irruzione di agenti patogeni secondari), cioè sono molto contagiosi ma poco letali. Le manifestazioni cliniche vanno dalle forme asintomatiche fino all'insorgenza di una malattia lieve con sintomi generalizzati. Gli animali colpiti manifestano un generale malessere con depressione, attività ridotta, tendenza ad accalcarsi, penne arruffate, minor consumo di mangime e di acqua e sintomi respiratori e gastrointestinali quali dispnea, tosse, starnuti, brividi, rantoli, lacrimazione, congiuntivite e diarrea. Spesso c'è anche un netto calo dell'ovodeposizione.

I virus HPAI hanno morbilità e mortalità alte fino al 100%. La morte può sopraggiungere nella fase iperacuta senza ancora lo sviluppo di sintomi. Se viene superata la prima fase d'infezione, la replicazione diventa sistemica con danni multi organo ed evidenti manifestazioni di malattia.

L'animale si muove meno, consuma meno acqua e meno cibo, è disidratato, depresso e svogliato, riduce le vocalizzazioni. Può avere diarrea. Avviene un calo drastico dell'ovodeposizione fino alla completa cessazione. Questa fase della malattia può talvolta portare il volatile alla morte. In caso di sopravvivenza, dopo qualche giorno, anche a seconda del ceppo virale, possono manifestarsi sintomi neurologici, con torcicollo, tremori, opistotono, nistagmo, paresi/paralisi delle zampe e delle ali, movimenti in circolo, convulsioni, perdita dell'equilibrio e incoordinazione. I sintomi respiratori come tosse e starnuti sono generalmente meno evidenti rispetto ai LPAI (Swayne e Pantin-Jackwood, 2008).

1.2.5 LESIONI ANATOMOPATOLOGICHE

I danni causati dai virus influenzali derivano dal danno diretto provocato dalla replicazione del virus, dagli effetti indiretti dei mediatori cellulari e dall'ischemia derivante dalla trombosi vascolare (Swayne e Pantin-Jackwood, 2008).

Lesioni macroscopiche

Gli animali infetti con virus LPAI mostrano edema dei seni infraorbitali, rinite e sinusite sierose/ fibrinose/ purulente, edema e congestione della trachea, broncopolmonite fibrinopurulenta (in caso d'irruzione di agenti secondari) e aerosacculite catarrale/ fibrinosa/ muco purulenta; ancora, enterite catarrale/ fibrinosa con tiflite e proctite, regressione dei follicoli ovarici con emorragie e rotture e possibile ovaro-peritonite. Nel tacchino sono stati sporadicamente descritti edema dei reni ed emorragie multifocali del pancreas (Swayne e Pantin-Jackwood, 2008).

L'influenza ad alta patogenicità rivela ampie aree di edema, emorragia e necrosi. In fase iperacuta (giorni 1-2) si instaurano il danno vascolare e la viremia con danno endoteliale e aumento della permeabilità con edemi e emorragie. Se l'animale muore in questa fase le lesioni sono spesso ancora assenti o scarse. Con la diffusione sistemica e la replicazione del virus (fase acuta, giorni 3-5) spiccano le lesioni necrotiche, soprattutto a livello di cute, encefalo, cuore, pancreas, polmoni, surreni, organi linfoidei primari e secondari. Di conseguenza le lesioni comprendono edema sottocutaneo diffuso e periorbitale, petecchie ed emorragie nel sottocute e su cresta e bargigli (Figura 4a) oltre che a livello di superfici mucose e sierose, epicardio (Figura 4c), muscoli pettorali e della coscia, a volte anche di tonsille cecali e diverticolo di Meckel.

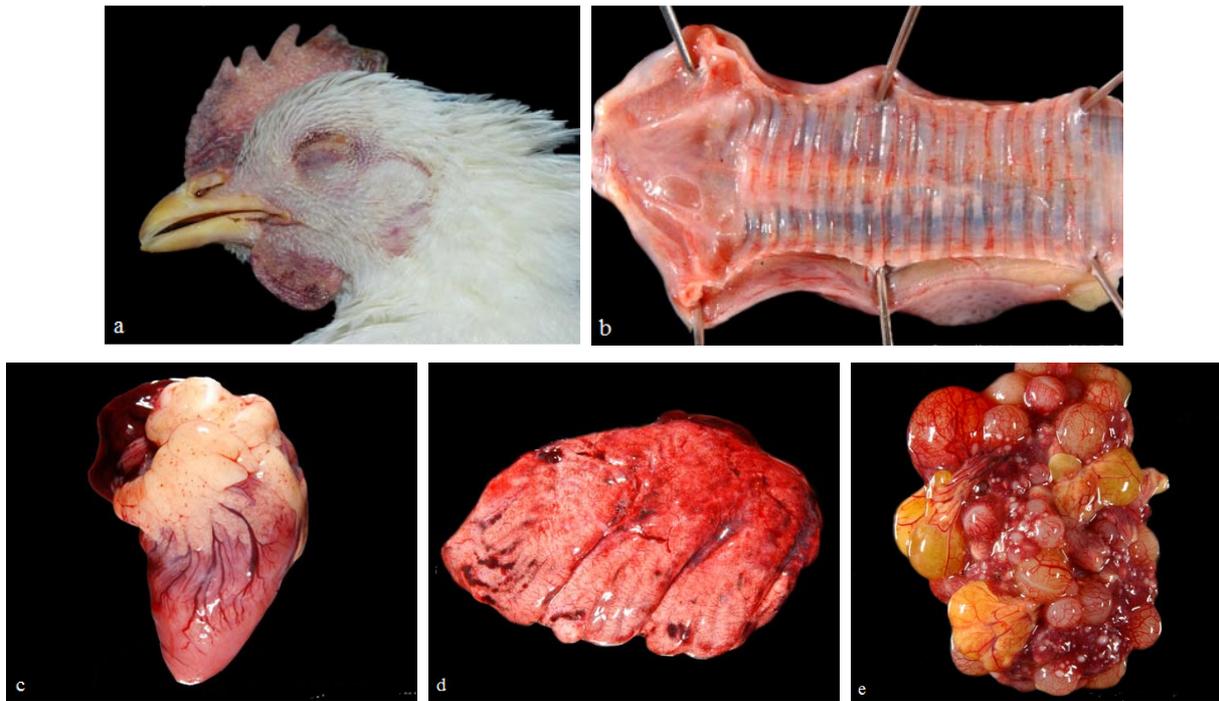


Figura 4: Lesioni macroscopiche da influenza HPAI nel pollo. a, Cresta e bargigli: aree di ecchimosi, necrosi e cianosi (3 dpi); b, trachea: congestione dei vasi sanguigni e presenza di muco (2 dpi); c, cuore: petecchie ed emorragie in grasso pericardico ed epicardio (3 dpi); d, polmone: emorragie multifocali con edema e congestione (2 dpi); e, ovaio: congestione acuta ed emorragie con atresia follicolare (2 dpi). Da *Atlas of avian diseases*, Cornell University (partnersah.vet.cornell.edu/avian-atlas).

Si osservano congestione ed emorragie anche su trachea (Figura 4b), pancreas e reni. I follicoli ovarici sono in fase di regressione o rottura con segni di peritonite (Figura 4e). Sono presenti foci necrotici sul cuore e, occasionalmente, sul fegato, sulla milza e sul rene. È presente polmonite interstiziale diffusa (Figura 4d). Negli animali giovani c'è una grave atrofia del timo e della borsa di Fabrizio (Acland et al., 1984; Nili et al., 2008; Swayne e Pantin-Jackwood, 2008; Woo et al., 2011).

Lesioni microscopiche

Le lesioni istologiche caratterizzanti le infezioni da virus LPAI interessano prevalentemente gli apparati respiratorio e gastroenterico. Si osservano infiltrato infiammatorio di eterofili e/o linfociti a carico di trachea, bronchi, polmoni, intestino e ciechi. I tessuti linfoidei possono essere interessati da necrosi (Swayne e Pantin-Jackwood, 2008).

I virus HPAI causano apoptosi e necrosi delle cellule infette. Le nucleoproteine virali di solito sono espresse nel nucleo e nel citoplasma delle cellule circostanti i siti di cambiamenti istologici, ma anche all'interno delle cellule necrotiche (Woo et al., 2011).

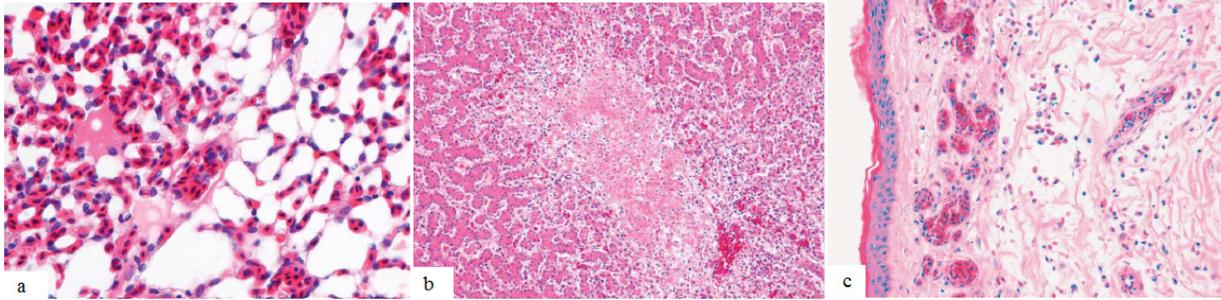


Figura 5: Esempi di lesioni istologiche da HPAI nel pollo. a, Polmone, H&E 40X: polmonite interstiziale eterofilica con edema nei capillari aeriferi; b, fegato, H&E 10X: area di necrosi epatocellulare con infiltrato mononucleare ai margini; c, cute dei bargigli, H&E 20X: abbondante edema interstiziale con emorragie. Da van Riel et al., 2009.

In fase acuta c'è soprattutto necrosi, successivamente l'infiammazione, l'edema e l'emorragia prevalgono. Tra le lesioni comunemente osservate nell'apparato respiratorio si registrano rinite e sinusite eterofiliche con presenza di necrosi ed essudato, edema della trachea con lieve infiammazione eterofilica e possibile scomparsa delle ciglia, polmonite interstiziale con infiltrato eterofilico, emorragie, vasculite e necrosi endoteliale (Figura 5a); nel cuore miocardite e necrosi dei miociti; a livello encefalico encefalite e meningite con manicotti perivascolari di linfociti e macrofagi e necrosi neuronale; nel tratto enterico emorragie, deplezione linfoide, enterite e necrosi delle cellule epiteliali. Sono evidenti caratteri di deplezione linfoide a livello di milza, midollo osseo, timo e borsa di Fabrizio. Il pancreas mostra segni di pancreatite e di necrosi degli acini. Focolai necrotici si osservano anche in fegato (Figura 5b), milza, tubuli renali e ghiandola surrenale. È presente edema sottocutaneo diffuso, esteso anche a livello di cresta e bargigli (Figura 5c), con microtrombosi dei capillari cutanei e vasculite con formazione di bolle e vescicole. I muscoli, soprattutto del petto e della coscia, sono infiammati ed emorragici. Il coinvolgimento dell'apparato riproduttore può condurre all'insorgenza di ovaro-peritonite (Acland et al., 1984; Perkins e Swayne, 2001; Nili et al., 2008; Woo et al., 2011). Le lesioni da focolai HPAI nei volatili selvatici sono simili a quelle descritte nel pollame domestico: interessano prevalentemente le prime vie respiratorie, il cuore, l'encefalo e il pancreas, e il sito di danno preminente può variare a seconda del ceppo virale e della specie ospite interessata (Teifke et al., 2007; Bröjer et al., 2009; Ogawa et al., 2009).

1.2.6 CENNI SULLE EPIDEMIE DI H7N1 (1999-2001) E H7N3 (2002-2004) IN ITALIA

Tra il 1999 e il 2001 si sono registrate epidemie da H7N1 nelle aree ad alta densità di aziende avicole del Nord Italia. Il primo virus è stato isolato nel marzo 1999 e identificato come un agente di sottotipo H7 a bassa patogenicità. I focolai H7N1 LPAI hanno interessato

prevalentemente gli allevamenti di tacchini da carne e da riproduzione di Veneto e Lombardia (Capua e Marangon, 2000; Marangon, 2003). Tra marzo 1999 e dicembre 1999 si sono verificati 199 focolai di LPAI con una mortalità variabile dal 5% al 97% secondo l'età degli animali colpiti (Capua et al., 2000). Nel dicembre 1999 il virus è mutato ad uno stipite HPAI. L'H7N1 HPAI ha avuto 100% di morbilità e 100% di mortalità e ha colpito tutte le specie di allevamento intensivo (tacchini, polli, faraone, quaglie). L'epidemia HPAI si è protratta da dicembre 1999 fino ad aprile 2000 con 413 focolai e circa 16 milioni di volatili morti o abbattuti. Quattro mesi dopo l'ultimo focolaio, il virus LPAI H7N1 è riemerso e si è diffuso in Veneto fino a marzo 2001, provocando 78 focolai di malattia quasi esclusivamente nei tacchini da carne. L'eradicazione è stata possibile grazie all'attivazione di un programma di vaccinazione eterologa (per H7N3), allo *stamping out*, alla limitazione dei movimenti, alla stretta applicazione delle misure di biosicurezza e al monitoraggio della situazione epidemiologica (Marangon, 2003).

Gli animali infetti con virus H7N1 LPAI mostravano dispnea, edema dei seni infraorbitali, congiuntivite, depressione, perdita dell'appetito e calo dell'ovodeposizione. Il rilievo anatomopatologico principale era costituito dal pancreas: macroscopicamente era emorragico e indurito, microscopicamente si osservavano necrosi focale degli acini con presenza dell'antigene virale. Inoltre erano presenti tappi di fibrina nei seni nasali e nella trachea. Le lesioni erano più evidenti nel tacchino che nel pollo, dove invece spesso l'infezione era asintomatica. La malattia HPAI portava a morte preceduta da sintomi neurologici. L'unico rilievo istologico comune tra i diversi focolai era la pancreatite, con necrosi focale o diffusa grave circondata da infiltrato infiammatorio, edema interstiziale e talvolta peritonite fibrinosa. Altre lesioni coinvolgevano la milza con foci necrotici e le tonsille cecali con emorragie. La nucleoproteina virale NP era presente nel pancreas esocrino, nel tessuto nervoso e nel cuore (Capua et al., 2000).

In ottobre 2002 ha iniziato a circolare negli allevamenti di tacchini del Nord Italia un nuovo virus influenzale identificato come H7N3 a bassa patogenicità (Cattoli et al., 2003). Il gene H7 era correlato ma non identico a quello dell'H7N1 di pochi anni prima (Di Trani et al., 2004) e N3 non era da ritenersi correlato al ceppo vaccinale circolato. Tra ottobre 2002 e settembre 2003 sono stati riscontrati 388 focolai. L'infezione è stata controllata tramite lo *stamping out*, il controllo delle movimentazioni, le misure di biosicurezza e la vaccinazione eterologa. Da settembre a dicembre 2004 il virus H7N3 LPAI ha ripreso a propagarsi con nuovi focolai anche all'interno degli allevamenti sottoposti a vaccinazione (Beato et al., 2014).

I primi casi erano asintomatici, poi gli animali, sia gli adulti che soprattutto i giovani, hanno iniziato a mostrare i sintomi caratteristici della patologia quali depressione, disturbi respiratori e forte calo dell'ovodeposizione. La morbilità registrata è stata del 100% e la mortalità del 3-7% (con qualche picco al 30%). Le lesioni erano simili a quelle osservate durante le epidemie LPAI di H7N1 del 1999-2001, ma meno gravi. Il rilievo costante nei tacchini era la pancreatite acuta, associata a congestione dei polmoni e della trachea, aerosacculite e (nei riproduttori) ovaro-peritonite (Cattoli et al., 2003).

2. SCOPO DELLA TESI

L'obiettivo principale di questo lavoro di tesi è stato quello di fornire una descrizione delle lesioni istopatologiche in pancreas di animali infettati sperimentalmente con virus influenzali aviari a bassa patogenicità (LPAI AIV) dei sottotipi H7N1 e H7N3 isolati in Italia durante le epidemie del 1999 e del 2003 e di ricercare una correlazione tra l'infezione virale e un'alterata funzionalità dell'organo (es. pancreatite o diabete).

A questo scopo sono stati analizzati mediante analisi istopatologica tessuti pancreatici di 28 tacchini infetti e di 2 tacchini controlli negativi non infetti, prelevati in un arco temporale di 39 giorni, consentendo l'osservazione dell'evoluzione delle lesioni in questo arco di tempo.

Successivamente è stata utilizzata una metodica di colorazione immunoistochimica per individuare la presenza del virus influenzale; questo ha permesso di valutare la localizzazione virale all'interno delle componenti esocrina ed endocrina dell'organo, per stabilire se potessero costituire un target di replicazione virale.

Con la medesima metodica è stata valutata sia qualitativamente sia quantitativamente anche l'espressione di insulina e glucagone al fine di verificare se, nel contesto di interessamento dell'organo, il pancreas endocrino potesse subire lesioni e alterazioni della funzionalità correlate con i valori di glicemia precedentemente misurati.

3. MATERIALI E METODI

3.1 CAMPIONAMENTO

In questo studio sono stati presi in esame campioni di pancreas derivanti da 28 tacchini infettati sperimentalmente per via oro-nasale con virus influenzali di tipo A a bassa patogenicità (LPAI) e 2 tacchini non infetti quale controllo negativo per un totale di 30 campioni analizzati. I campioni analizzati provenivano da un precedente progetto sperimentale effettuato presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVE) di Legnaro (PD) nel quale si voleva mettere in luce una possibile correlazione tra infezione da virus influenzale LPAI e insorgenze di patologie a carico del pancreas, quali pancreatite e diabete (Capua et al., 2013). I pancreas inclusi in paraffina derivanti dai tacchini infettati in questa prova sperimentale sono stati inviati al Dipartimento di Biomedicina comparata e Alimentazione dell'Università di Padova per gli approfondimenti istopatologici su cui è incentrato il lavoro di tesi.

Gli animali utilizzati per la prova sperimentale erano tacchini da carne di sesso femminile alimentati *ad libitum* e infettati a tre settimane di età per via oro-nasale con due diversi tipi di ceppi virali LPAI isolati durante epidemie in Italia: in particolare diciassette tacchini sono stati infettati con A/turkey/Italy/3675/1999 (H7N1) e undici con A/turkey/Italy/2962/2003 (H7N3), mentre i due animali di controllo hanno ricevuto liquido allantoideo negativo tramite la stessa via (Capua et al., 2013).

Durante la sperimentazione i tacchini sono stati osservati due volte al giorno allo scopo di individuare i sintomi clinici conseguenti all'infezione virale e, in un sottogruppo di animali, sono stati effettuati prelievi di sangue venoso per la determinazione delle concentrazioni sieriche di glucosio e lipasi ai giorni 0, 7, 14 e 21 post infezione.

I tacchini infetti sono stati sacrificati a differenti intervalli temporali dall'infezione, a 4, 7, 8, 9, 10, 17 e 39 giorni post infezione (dpi), mentre i due animali di controllo a 8 e 10 giorni dopo l'inoculazione del liquido allantoideo (Tabella 1). Da ogni animale sacrificato è stato prelevato il pancreas che è stato messo in RNAlater per i successivi studi di biologia molecolare e fissato in formalina tamponata al 10% (formaldeide al 4%) per i successivi studi istopatologici. In alcuni sottogruppi di campioni è stata appurata la presenza di RNA virale tramite RRT-PCR (*real-time reverse transcriptase PCR*) all'interno dei pancreas, del sangue e della trachea.

L'infezione sperimentale e le analisi descritte sono state svolte da parte dall'IZSVe in una fase precedente allo studio qui presentato, poiché esso si articola all'interno di un progetto più ampio. Tali dati vengono comunque qui inclusi a beneficio di una più ampia interpretazione dei risultati.

Tabella 1: Elenco dei tacchini oggetto di campionamento con codici identificativi, sottotipi virali di infezione e intervalli di sacrificio.

Numero progressivo	Sottotipo virale	Intervallo di sacrificio (dpi)	Fase
1	H7N1	4	Precoce
2	H7N1	4	Precoce
3	H7N1	4	Precoce
4	H7N1	4	Precoce
5	H7N3	4	Precoce
6	H7N3	4	Precoce
7	H7N3	4	Precoce
8	H7N3	4	Precoce
9	H7N1	7	Precoce
10	H7N1	7	Precoce
11	H7N1	7	Precoce
12	H7N1	7	Precoce
13	H7N1	7	Precoce
14	H7N1	8	Intermedia
15	H7N3	8	Intermedia
16	H7N1	9	Intermedia
17	H7N1	9	Intermedia
18	H7N3	9	Intermedia
19	H7N1	10	Intermedia
20	H7N3	10	Intermedia
21	H7N1	17	Intermedia
22	H7N3	17	Intermedia
23	H7N3	39	Tardiva
24	H7N3	39	Tardiva
25	H7N1	39	Tardiva
26	H7N3	39	Tardiva
27	H7N1	39	Tardiva
28	H7N1	39	Tardiva
29	Controllo	10	
30	Controllo	17	

3.2 ESAME ISTOPATOLOGICO

I campioni di pancreas comprendono sezioni provenienti da otto tacchini sacrificati a 4 giorni post infezione, cinque a 7 giorni, due a 8, tre a 9 giorni, due a 10, due a 17 e sei a 39 giorni post infezione, e da due controlli sacrificati a 10 e 17 giorni dopo l'inoculazione del liquido

allantoideo negativo. I campioni sono stati fissati in formalina tamponata al 10% (formaldeide al 4%) e inclusi in paraffina. Con il microtomo sono state tagliate sezioni di spessore di 4µm, montate su vetrini portaoggetto e colorate secondo procedura standard con ematossilina e eosina (H&E). Per la valutazione morfologica è stato utilizzato un microscopio ottico Olympus BX-40. Ogni sezione è stata analizzata e ogni lesione identificata è stata valutata per gravità come grado 1/lieve, grado 2/moderata e grado 3/grave.

Valutazione della fibrosi

Per valutare il grado di fibrosi riscontrata all'osservazione in H&E e indagare la deposizione di tessuto connettivo ulteriori sezioni da ognuno dei 30 pancreas già fissati e inclusi sono state montate su vetrini portaoggetto SuperFrost® Plus (Menzel-Gläser) a carica positiva e colorate manualmente con kit per la tricromica di Masson (Bio-Optica).

Secondo indicazioni della ditta produttrice, per l'allestimento dei vetrini è necessario:

- a. reidratare le sezioni e portarle all'acqua distillata;
- b. immergere il vetrino per 10 minuti nella soluzione di ematossilina ferrica di Weigert;
- c. sgocciolare il vetrino e introdurlo nella soluzione alcolica di acido picrico per 4 minuti;
- d. sciacquare con acqua distillata e porre il vetrino per 4 minuti in soluzione Ponceau B;
- e. lavare il vetrino e lasciarlo agire in soluzione di acido fosfomolibdico per 10 minuti;
- f. sgocciolare e porre in blu di anilina secondo Masson per 8 minuti;
- g. lavare in acqua distillata, disidratare la sezione attraverso la scala ascendente degli alcool e montare i vetrini coprioggetto con balsamo.

La tecnica associa una colorazione dei nuclei tramite ematossilina ferrica di Weigert, degli eritrociti con acido picrico e del tessuto connettivo con due coloranti acidi. All'osservazione al microscopio, colora il collagene e il muco di blu, il citoplasma, la cheratina, le fibre muscolari e i granuli acidofili di rosso, gli eritrociti di giallo e i nuclei e i gameti di nero.

Tutte le sezioni colorate con H&E e con tricromica di Masson sono state osservate per la ricerca morfologica di segni di fibrosi pancreatica, quali aree di fibrosi interstiziale e ispessimento dei setti. All'osservazione delle sezioni colorate con tricromica di Masson la deposizione del collagene appare come una matrice fibrillare a distribuzione interstiziale diffusa e colore blu. Tutte le sezioni di pancreas sono state osservate in 10 campi a basso ingrandimento e la presenza di fibrosi è stata quantificata come assente (grado 0), lieve (grado 1), moderata (grado 2) e grave (grado 3).

Valutazione semi-quantitativa di lesioni pancreatiche

Un'ulteriore valutazione di tipo semi-quantitativo è stata svolta giudicando le sezioni (H&E e tricromiche) tramite l'adattamento del sistema indicato da De Cock e collaboratori per la valutazione istopatologica della pancreatite nel gatto: esso riflette la gravità del quadro infiammatorio secondo uno schema di punteggi attribuito alle singole lesioni presenti (De Cock et al., 2007). Rispetto allo schema originale i valori percentuali sono stati riadattati per non perdere la discriminazione tra diverse classi di gravità.

Le lesioni qui prese in considerazione come tipiche della pancreatite acuta sono l'infiammazione eterofilica, l'edema interstiziale e la necrosi, cui è stato attribuito un punteggio variabile da 0 a 3 secondo i criteri riportati in Tabella 2. Sulla base della somma dei punteggi è stato ricavato un risultato totale massimo di 6 punti in cui il punteggio di 0 su 6 è stato considerato come normale morfologia pancreatica, di 1-2 su 6 come pancreatite acuta lieve, di 3-4 su 6 come moderata e di 5-6 su 6 come pancreatite acuta grave.

Tabella 2: Sistema di punteggio per lesioni tipiche di pancreatite acuta (da De Cock et al., 2007; modificato).

Punteggio	Infiammazione	Edema e necrosi
0	Infiltrato eterofilico assente	Assente
1	Infiltrato eterofilico lieve, <15% parenchima pancreatico coinvolto	Lieve, <15% parenchima coinvolto
2	Infiltrato eterofilico moderato, 15-30% parenchima pancreatico coinvolto	Moderato, 15-30% parenchima coinvolto
3	Infiltrato eterofilico grave, >30% parenchima pancreatico coinvolto	Grave, >30% parenchima coinvolto

Come lesioni caratterizzanti la pancreatite cronica sono state considerate l'infiltrato linfocitico e la fibrosi interstiziale, ognuna delle quali ha ricevuto un punteggio variabile da 0 a 3. Sulla scala di punteggio totale spaziante da 0 a 6, lo 0 su 6 è stato considerato come normale morfologia pancreatica, mentre i punteggi 1-2, 3-4 e 5-6 su 6 sono stati interpretati rispettivamente come pancreatite cronica lieve, moderata, grave. La presenza di scarsi linfociti disseminati non è stata giudicata come elemento patologico. Plasmacellule eventualmente presenti sono state prese in considerazione ai fini della stima del danno infiammatorio assieme ai linfociti. I criteri di attribuzione del punteggio sono riportati in Tabella 3.

Tabella 3: Sistema di punteggio per lesioni tipiche di pancreatite cronica (da De Cock et al., 2007; modificato)

Punteggio	Infiammazione	Fibrosi
0	Linfociti assenti o occasionali	Assente
1	Infiltrato linfocitico lieve, <15% parenchima pancreatico coinvolto	Lieve ispessimento dei setti o aree multifocali di fibrosi interstiziale (<15% parenchima coinvolto)
2	Infiltrato linfocitico moderato, 15-30% parenchima pancreatico coinvolto	Moderato ispessimento della maggior parte dei setti (15-30% parenchima coinvolto)
3	Infiltrato linfocitico grave, >30% parenchima pancreatico coinvolto	Grave ispessimento di tutti i setti con tessuto fibroso e/o divisione in lobuli, >30% parenchima coinvolto

Dal momento che alcune sezioni presentavano caratteristiche tipiche sia dell'infiammazione acuta sia dell'infiammazione cronica, tutte e 30 le sezioni hanno contemporaneamente ricevuto valutazione e punteggio per le lesioni tipiche sia di pancreatite acuta sia cronica.

3.3 ESAME IMMUNOISTOCHEMICO

L'immunoistochimica (IHC) è una procedura che consente di evidenziare la formazione di complessi antigene-anticorpo all'interno di un tessuto grazie ad appositi sistemi di rivelazione. È uno strumento particolarmente utilizzato nella diagnosi di patologie infettive poiché consente l'identificazione dell'agente eziologico, eventualmente con la co-localizzazione rispetto alle lesioni identificate mediante tecniche di istologia, rendendolo un metodo diagnostico molto sensibile e specifico (Ramos-Vara et al., 2008).

3.3.1 TECNICA IMMUNOISTOCHEMICA AUTOMATICA

Le IHC per l'espressione di glucagone e insulina sono state svolte con un immunocoloratore automatizzato (BenchMark XT, Ventana Medical Systems). Il macchinario può processare contemporaneamente fino a 30 vetrini con protocolli indipendenti grazie al riconoscimento automatico degli stessi tramite sistema di codici a barre e l'utilizzo di piastre singole riscaldanti. Esso svolge ognuno dei passaggi della colorazione immunoistochimica (deparaffinatura, smascheramento, incubazione, rivelazione e controcolorazione) in maniera automatica, fatta eccezione per la sola aggiunta dell'anticorpo che deve essere svolta manualmente con l'uso di una micropipetta. Ogni altro reagente è aggiunto dalla macchina e mescolato sul vetrino tramite getti di aria; l'evaporazione è impedita dalla stesura di una pellicola oleosa sopra alla sezione stessa.

Come sistema di rilevazione è stato utilizzato ultraView™ Universal DAB Detection Kit (Ventana Medical Systems), kit composto da cinque reagenti (DAB Inhibitor, HRP Multimer, DAB Chromogen, DAB H₂O₂ e DAB Copper) basato su un multimer biotina-free che coniuga su uno scheletro polimerico anticorpo secondario e perossidasi Horseradish adatto per la rilevazione indiretta di anticorpi primari di coniglio e di topo. Il prodotto finale si rivela quindi come una colorazione marrone.

Le sezioni di pancreas tagliate a 4µm e montate su vetrini portaoggetto SuperFrost® Plus a carica positiva hanno sostato in stufa a 37°C per 30 minuti prima dell'inizio della corsa di colorazione con BenchMark.

IHC glucagone

Ogni sezione è stata deparaffinata e poi incubata per 32 minuti a temperatura ambiente con 100 µl di un anticorpo policlonale di coniglio anti-glucagone (Polyclonal rabbit anti-glucagon, Dako) diluito 1:800 in Antibody Diluent (Ventana Medical Systems). È seguita controcolorazione in ematossilina di 4 minuti (Tabella 4).

Per ogni corsa di colorazione è stato inserito un vetrino con funzione di controllo negativo nel quale l'anticorpo è stato sostituito da 100 µl di Antibody Diluent.

IHC insulina

Le sezioni di pancreas hanno subito deparaffinatura e smascheramento con CC1 ridotto (Cell Conditioning 1, 30 minuti, 95°C). L'incubazione con l'anticorpo primario è avvenuta a 37°C per 2 ore con 100 µl di anticorpo di topo anti-insulina (Mouse monoclonal anti-insulin antibody E2E3 NB120-9569, Novus Biologicals) diluito 1:50 in Antibody Diluent. I vetrini sono stati infine controcolorati in ematossilina per 4 minuti (Tabella 4).

Come controllo negativo è stata utilizzata una ulteriore sezione in cui è stata omessa l'aggiunta dell'anticorpo e sostituita con il diluente.

Una volta colorati, i vetrini sono stati lavati in acqua corrente e detergente per eliminare la pellicola oleosa residua. Sono stati poi disidratati manualmente attraverso la scala ascendente degli alcoli (alcool 50%, 70%, 90% e 100%, passaggi di 2 minuti ciascuno), portati in xilene e montati con vetrino coprioggetto con balsamo.

Tabella 4: Protocolli di IHC automatica per glucagone e insulina

IHC glucagone	
Anticorpo primario	<i>Polyclonal rabbit anti-glucagon</i> , 1:800 per 32 min temperatura ambiente
Ultrawash	Sì
Controcolorazione	Ematossilina, 4 min
IHC insulina	
Smascheramento	CC1 30 min
Anticorpo primario	<i>Mouse monoclonal anti-insulin antibody</i> , 1:50 per 2 h a 37°C
Ultrawash	Sì
Controcolorazione	Ematossilina, 4 min

Valutazione delle positività e analisi statistica

I vetrini delle IHC sono stati osservati al microscopio ottico per la valutazione dell'espressione pancreatica di glucagone e insulina. Inoltre è stata eseguita una valutazione quantitativa delle dimensioni delle isole di Langerhans tramite elaborazione digitale delle immagini. I vetrini immunocolorati per glucagone e per insulina sono stati scansionati a ingrandimento 20X con il microscopio digitale D-Sight (Menarini Diagnostics) e, utilizzando il software analizzatore di immagini D-Sight Viewer, sono stati selezionati dieci campi per ogni vetrino in base alla presenza di positività al loro interno. La superficie dei gruppi di cellule endocrine è stata calcolata delineandone il perimetro con uno strumento di selezione a mano libera con calcolo automatico dell'area selezionata espresso in μm^2 (Figura 6).

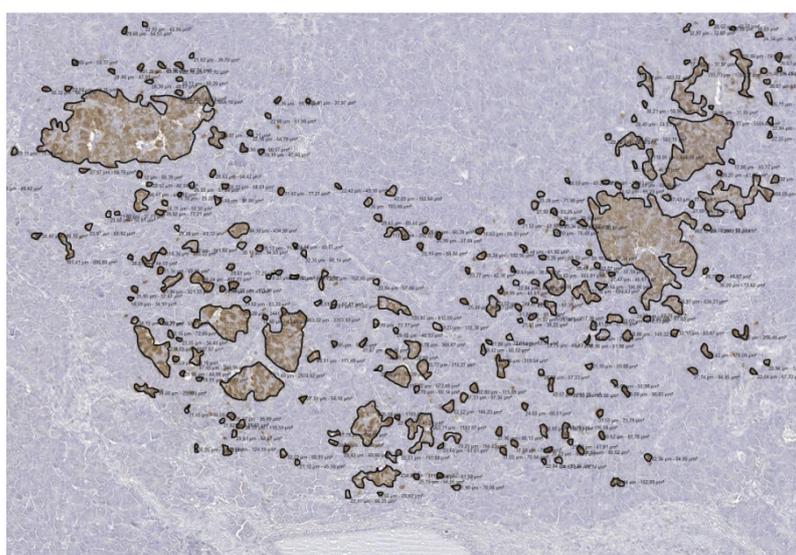


Figura 6: Esempio di analisi morfometrica in un campo. I perimetri degli elementi positivi sono stati selezionati manualmente ed è stata calcolata automaticamente in μm^2 l'area così delineata. Tacchino, pancreas, IHC glucagone, 20X.

Nel tracciare i perimetri degli elementi positivi presenti nei campi sono stati considerati tutti gli elementi positivi, dalle cellule singole fino alle isole strutturalmente organizzate come tali. Sono state calcolate le dimensioni medie delle aree positive e la percentuale di superficie positiva sulla superficie totale di tessuto. Questi parametri sono stati analizzati in relazione alla fase temporale del decorso post-infettivo e al tipo di diagnosi morfologica formulata

Le analisi statistiche relative alle differenze istolesive e di espressione di insulina e glucagone tra i gruppi di soggetti sono state effettuate mediante l'utilizzo dei test non parametrici quali test di Kruskal-Wallis, test di Mann Whitney, test di Wilcoxon. Il limite di significatività dei test è stato fissato per $p \leq 0.05$. In particolare si sono valutate la differenza nell'espressione di insulina e glucagone tra soggetti con danno acuto/cronico, tra soggetti con danno lieve/moderato/grave e tra soggetti in fase post-infettiva precoce/intermedia/tardiva. Le differenze tra categorie istolesive sono state valutate similmente per i diversi periodi post-infezione.

3.3.2 TECNICA IMMUNOISTOCHEMICA MANUALE

La ricerca del virus influenzale (AIV) mediante tecnica immunocistochemica, è stata eseguita con una procedura manuale per poter ottimizzare le condizioni (come tempi di incubazione, temperature di incubazione, diluizioni) specifiche del test. Il protocollo è stato standardizzato solo dopo diverse prove necessarie alla sua messa a punto.

Tutti i passaggi descritti nel protocollo sono stati eseguiti su vetrini posizionati all'interno di una camera umida allestita appositamente per evitare l'evaporazione dei reagenti, considerando che ogni reagente è stato aggiunto manualmente a goccia sui singoli vetrini con lunghi tempi di incubazione.

1. I vetrini sono stati lasciati a incubare in stufa a 37°C overnight in modo da agevolare le successive fasi di deparaffinazione e smascheramento. Per poter effettuare le colorazioni sui tessuti, le sezioni sono quindi state deparaffinate e reidratate: dopo due passaggi di 5 minuti in xilene, hanno attraversato soluzioni a concentrazioni decrescenti di alcool (alcool 100%, alcool 90%, alcool 70%, alcool 50%) sostando per 5 minuti in ognuna fino a giungere all'acqua distillata.
2. È stato poi effettuato lo smascheramento degli antigeni tramite digestione con soluzione enzimatica di tripsina al 10% in acqua distillata (kit Digest-all, Invitrogen) incubando i vetrini in stufa a 37°C per 10 minuti. Lo smascheramento, o *antigen retrieval*, è

necessario per reversibilizzare le modifiche conformazionali indotte alle proteine dalla fissazione in formalina e aumentare così la quota di epitopi accessibili per il successivo legame con l'anticorpo. I principali metodi adottati per raggiungere questo scopo sono la digestione enzimatica e il calore, spesso utilizzati in combinazione come in questa circostanza.

3. Le perossidasi endogene sono state quindi bloccate (*blocking*) incubando i vetrini per 10 minuti a temperatura ambiente con 3% di perossido di idrogeno (H_2O_2) diluito in PBS (*Phosphate Buffered Saline*). Inibire gli enzimi endogeni consente di aumentare la specificità della colorazione, dato che la presenza nei tessuti degli stessi enzimi impiegati durante la colorazione immunostochimica può comportare il rischio di indesiderate colorazioni aspecifiche di fondo.

Il PBS è una soluzione tampone isotonica atossica: è stata allestita utilizzando acqua distillata, NaH_2PO_4 (fosfato di sodio monobasico), Na_2HPO_4 (fosfato di sodio dibasico) e NaCl (cloruro di sodio) e portando la soluzione a pH 7,0. È stata utilizzata come liquido di diluizione e di lavaggio.

4. Dopo tre lavaggi di 5 minuti in PBS 1X, per diminuire ulteriormente la colorazione di fondo è stato eseguito un *blocking* dei legami aspecifici utilizzando BSA (*Bovine Serum Albumin*, albumina di siero bovina) al 5% in PBS per 40 minuti; la BSA agisce occupando siti antigenici ai quali gli anticorpi primario e secondario potrebbero legarsi in modo aspecifico.

Dopo tre lavaggi in PBS, i vetrini sono pronti per l'incubazione con gli anticorpi.

Per l'evidenziazione dell'agente viene utilizzato un anticorpo primario diretto contro l'antigene tissutale e un anticorpo secondario diretto contro l'anticorpo primario e coniugato con molecole che si legano al complesso formatosi: questo permette la visualizzazione del legame mediante sistema chimico di rivelazione.

5. Le 28 sezioni di pancreas infetti e le 2 dei non infetti sono state incubate per un'ora a temperatura ambiente con l'anticorpo primario, un anticorpo di topo diretto contro la nucleoproteina NP dei virus influenzali di tipo A (Mouse anti-influenza A, NP subtype A, clone 238, European Veterinary Laboratory) diluito 1:100 in BSA al 2,5% in PBS.
6. Dopo lavaggi in PBS, alle sezioni è stato aggiunto l'anticorpo secondario complessato con perossidasi, ossia Goat anti-mouse IgG2a HRP (Horseradish Peroxidase) (Southern Biotech), diluito 1:200 in BSA al 2,5% in PBS, per un'ora a temperatura ambiente.

I vetrini sono stati lavati con tre passaggi in PBS.

Per confermare la specificità del test, è stato allestito un vetrino come controllo negativo tramite l'omissione dell'anticorpo primario e la sua sostituzione con 100 µl di soluzione diluente (BSA 2,5% in PBS), testando così la specificità di legame dell'anticorpo secondario e del sistema di rivelazione. A verifica della sensibilità, è stato sfruttato come controllo positivo un campione di pancreas ritenuto infetto in base al test RRT-PCR effettuato in precedenza dall'Istituto Zooprofilattico.

Per visualizzare la reazione, esistono diversi sistemi di rilevazione che consentono di evidenziare l'immunocomplesso in base a viraggi cromatici derivati dalla reazione tra l'enzima complessato all'anticorpo secondario e il suo substrato e cromogeno.

7. Qui la reazione con la perossidasi è stata sviluppata tramite incubazione delle sezioni con soluzione diaminobenzidina (DAB) – perossido di idrogeno (sistema EnVision, Dako) come cromogeno e substrato, che determina un precipitato di colore marrone a livello di sito antigenico.
8. Dopo lavaggio di 5 minuti in acqua distillata, i vetrini sono stati controcolorati con ematossilina di Meyer per 1 minuto, poi lavati e disidratati manualmente lungo la scala ascendente degli alcoli (alcol 50%, 70%, 90% e 100%, per 2 minuti ciascuno) e infine, dopo un doppio passaggio in xilene, montati con vetrino coprioggetto.

Tutti i dettagli del protocollo sono riassunti in Tabella 5.

Tabella 5: Protocollo di IHC manuale per AIV

Incubazione	Overnight a 37°C
Smascheramento	Tripsina 10%, 10 min a 37°C
Blocco perossidasi endogene	H ₂ O ₂ 3%, 10 min a temperatura ambiente
Blocking	BSA 5 %, 40 min a temperatura ambiente
Anticorpo primario	Mouse anti-influenza A, 1:100, 1 h a temperatura ambiente
Anticorpo secondario	Goat anti-mouse IgG2a HRP, 1:200, 1 h a temperatura ambiente
Sistema di rivelazione	DAB – perossido di idrogeno

Per la valutazione delle positività i vetrini sono stati osservati al microscopio ottico ed è stata osservata la presenza di reazione avvenuta o meno e la localizzazione delle positività all'interno dei tessuti. La positività è attesa come intensa colorazione marrone delle cellule infette.

4. RISULTATI

4.1 ESAME CLINICO, MOLECOLARE E EMATOBIOCHIMICO

I tacchini analizzati in questo studio erano parte di un progetto più ampio che aveva lo scopo di studiare la possibile correlazione tra l'infezione da virus influenzale e l'insorgenza di patologie metaboliche a carico del pancreas, quali il diabete (Capua et al., 2013). Questo lavoro di tesi si è collocato all'interno del suddetto studio. L'infezione sperimentale degli animali con virus influenzali aviari LPAI dei sottotipi H7N1 e H7N3 è stata eseguita dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe). Sempre presso l'IZSVe, sono state eseguite le analisi cliniche, molecolari e biochimiche riportate in questo lavoro di tesi, perché hanno costituito la base per gli approfondimenti istopatologici e hanno permesso una più ampia discussione dei dati ottenuti. Il progetto sperimentale aveva coinvolto in totale 68 animali, suddivisi in tre gruppi omogenei: (a) un gruppo infettato con il sottotipo LPAI H7N1, (b) un gruppo infettato con virus LPAI H7N3 e (c) un gruppo di controllo non infettato (Capua et al., 2013). I campioni degli organi di 28 soggetti infettati e di 2 soggetti di controllo sono stati presi da questi gruppi e sono stati portati presso il Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione dell'Università di Padova per le indagini istopatologiche e immunoistochimiche. Il lavoro si è concentrato sulle analisi delle sezioni di pancreas.

Tutti i 28 tacchini infettati hanno mostrato segni clinici tipici della malattia, quali depressione e abbattimento del sensorio, scarsa mobilità, arruffamento delle penne, congiuntivite, gonfiore dei seni infraorbitali, scolo nasale sieroso / muco purulento e diarrea. I sintomi si sono risolti entro 15-20 giorni dall'infezione (Capua et al., 2013).

Per alcuni sottogruppi di animali è stata accertata la presenza del virus nelle prime vie aeree, nel sangue e nel pancreas tramite RRT-PCR, come riassunto in Tabella 6. Nei tamponi tracheali eseguiti su 5 animali, l'RNA virale è stato identificato a 2 giorni post infezione (dpi) in 4 di essi (80%) e a 3 dpi in tutti e 5 (100%). Negli stessi animali è stata accertata la presenza del virus nel sangue in 2/5 (40%). Negli animali deceduti per la patologia o soppressi secondo lo schema sperimentale erano stati prelevati ed indagati per la presenza del virus anche alcuni tessuti (pancreas), dai 4 ai 10 dpi. Il virus era presente in 10/17 (58,8%) campioni di pancreas. I controlli negativi non infettati sono risultati negativi alla ricerca di RNA virale.

Tabella 6: Presenza del virus in tamponi tracheali, sangue e pancreas identificata tramite esame molecolare e immunistoichimico.

Numero progressivo	Dpi	RRT-PCR				IHC AIV
		Trachea 2 dpi	Trachea 3 dpi	Sangue 3dpi	Pancreas	
1	4				+	+
2	4				+	-
3	4				-	-
4	4				-	-
5	4				-	-
6	4				-	-
7	4				-	-
8	4				+	+
9	7				-	-
10	7				+	-
11	7				+	+
12	7				+	-
13	7					+
14	8	+	+	-		-
15	8	+	+	+		-
16	9				+	+
17	9				-	-
18	9	+	+	+	+	+
19	10				+	-
20	10				+	-
21	17	+	+	-		-
22	17	-	+	-		-
23	39					-
24	39					-
25	39					-
26	39					-
27	39					-
28	39	-	-	-		-
29	<i>ctrl</i>					-
30	<i>ctrl</i>	-	-	-		-
Totale		4/5 80%	5/5 100%	2/5 40%	10/17 58,8%	6/28 21,4%

Legenda: + = positivo al virus, - = negativo al virus, spazio vuoto = analisi non eseguita; dpi = giorni post infezione; aiv = virus influenzale; ctrl = controllo. I dati totali si riferiscono ai soli infetti.

I parametri ematici analizzati per vedere la funzionalità pancreatica esocrina e endocrina sono stati rispettivamente la concentrazione di lipasi (U/L) e di glucosio (mmol/L). Poiché in letteratura non esistevano i range fisiologici di lipasi e di glucosio ematici nel tacchino, come intervalli di riferimento sono stati adottati i valori registrati nel gruppo di animali di controllo analizzato nella fase precedente di questo progetto. Qui la concentrazione normale media di lipasi era stata stimata $4,1 \pm 1,5$ U/L e la concentrazione di glucosio $15,1 \pm 1,7$ mmol/L (Capua et al., 2013).

Sono stati eseguiti i prelievi ematici prima dell'infezione e successivamente al giorno 7, 14 e 21 post infezione (pi), compatibilmente con gli intervalli di sacrificio previsti dal disegno sperimentale.

Tabella 7: Presenza di iperlipasemia e di iperglicemia a diversi intervalli post-infezione.

	Pre-infezione	7 dpi	14 dpi	21 dpi
Iperlipasemia	0/12, 0%	7/18, 38,9%	0/8, 0%	-
Iperglicemia	0/12, 0%	0/18, 0%	3/8, 37,5%	0/5, 0%

A una settimana dall'infezione si è osservato un aumento significativo (da 10 a 100 volte i valori di controllo) della concentrazione plasmatica di lipasi in 7/18 tacchini. Nello stesso intervallo di tempo la glicemia invece non ha subito alterazioni significative. Alla seconda settimana le concentrazioni di lipasi di tutti i campioni sono rientrate nel range fisiologico, mentre si è osservata iperglicemia in 4/8 animali, due dei quali erano gli stessi in cui si era registrato il rialzo delle lipasi nella prima settimana post infezione. I valori di glucosio hanno avuto poi la tendenza ad abbassarsi alla terza settimana (Tabella 7). Nel gruppo di controllo non infetto non si sono osservate alterazioni rilevanti nelle concentrazioni ematiche di lipasi e glucosio.

4.2 ESAME ISTOPATOLOGICO

L'analisi istopatologica è stata eseguita su pancreas prelevati in un periodo compreso tra 4 dpi e 39 dpi. Per valutare il decorso dell'infezione si è deciso di raggruppare i soggetti soppressi per settimane post infezione. All'interno di quella che è stata chiamata *fase precoce* sono presenti i 13 animali sacrificati a 4 dpi (8 casi) e 7 dpi (5 casi). La *fase intermedia* comprende i soggetti sacrificati a 8 dpi (2 casi), 9 dpi (3 casi), 10 dpi (2 casi) e 17 dpi (2 casi) per un totale di 9 casi, mentre la *fase tardiva* del decorso comprende i 6 casi campionati a 39 dpi. In questo lavoro è stato scelto di non tenere in considerazione il fatto che gli animali fossero stati infettati con il sottotipo virale LPAI H7N1 o H7N3, dal momento che l'infezione con lo stesso titolo di questi due virus non ha mostrato alcuna differenza nel quadro clinico e patologico degli animali (Capua et al., 2013).

Nei 28 campioni di pancreas prelevati e analizzati in questo studio, in 22 (78,6%) è stata evidenziata dopo esame istopatologico la presenza di una pancreatite di entità da lieve a grave e di stadio da acuto a cronico. Nelle fasi precoci del decorso post-infettivo è spiccata la presenza di una pancreatite necrotizzante acuta da multifocale a diffusa che con il progredire dei giorni post infezione è evoluta in una pancreatite fibrosante cronica associata a caratteri di

rigenerazione come l'iperplasia dei duttuli e la presenza di mitosi. In Tabella 8 sono riassunte le lesioni individuate nei campioni analizzati (v. anche Figura 15).

Tabella 8: Lesioni riscontrate durante l'esame istopatologico

		Fase precoce		Fase intermedia		Fase tardiva	
Esame istopatologico	eterofili	8/13	61,5%	7/9	77,8%	2/6	33,3%
	necrosi	4/13	30,8%	2/9	22,2%	0/6	0%
	edema	4/13	30,8%	4/9	44,4%	1/6	16,7%
	linfociti/ plasmacellule	7/13	53,8%	6/9	77,8%	6/6	100%
	fibrosi	4/13	30,8%	7/9	77,8%	6/6	100%
	iperplasia duttulare	2/13	15,4%	7/9	77,8%	1/6	16,7%
	mitosi	2/13	15,4%	4/9	44,4%	0/6	0%
	ndr	5/13	38,5%	1/9	11,1%	0/6	0%

Nei pancreas campionati nella fase precoce post-infezione, 5 casi su 13 (38,5%) non hanno mostrato la presenza di lesioni. Gli altri 8 (61,5%) hanno mostrato invece una pancreatite necrotizzante acuta in corso. In particolare si è osservata necrosi assieme ad infiltrato eterofilo e edema, aspetti caratteristici dell'inflammazione acuta (Figura 8a). La necrosi è stata descritta in 4 casi su 13 (30,8%) e ha coinvolto le cellule degli acini esocrini con estensione da multifocale a diffusa. Questo fenomeno necrotico è sembrato portare a una distruzione del parenchima con perdita della normale architettura dell'organo. Spesso vi si è associata la presenza di un infiltrato cellulare costituito da eterofili (8/13, 61,5%), solitamente a localizzazione periduttale o perivascolare. Questo fenomeno è stato lieve nel 30,8% dei campioni (4/13), ma ha raggiunto anche intensità moderata (3/13, 23,1%) e grave (1/13, 7,7%). Circa nella metà dei casi (7/13, 53,8%) si sono osservati anche alcuni linfociti: si è trattato di piccoli aggregati focali parafisiologici (5/13, 38,5%) localizzati nel parenchima esocrino e talvolta nel tessuto connettivale perighiandolare. Tuttavia in due campioni prelevati a 7 dpi (15,4%) questi hanno raggiunto il valore di vero e proprio infiltrato infiammatorio linfoplasmacellulare grave da multifocale a coalescente.

In alcuni campioni prelevati a 7 dpi, tra cui i due citati qui sopra, sono comparsi anche segni di fibrosi (4/13, 30,8%) e di iperplasia duttulare (2/13, 15,4%) e si sono osservate numerose mitosi (2/13, 15,4%). La presenza di edema interstiziale (4/13, 30,8%) e di essudato fibrinoso ha completato il quadro delle lesioni.

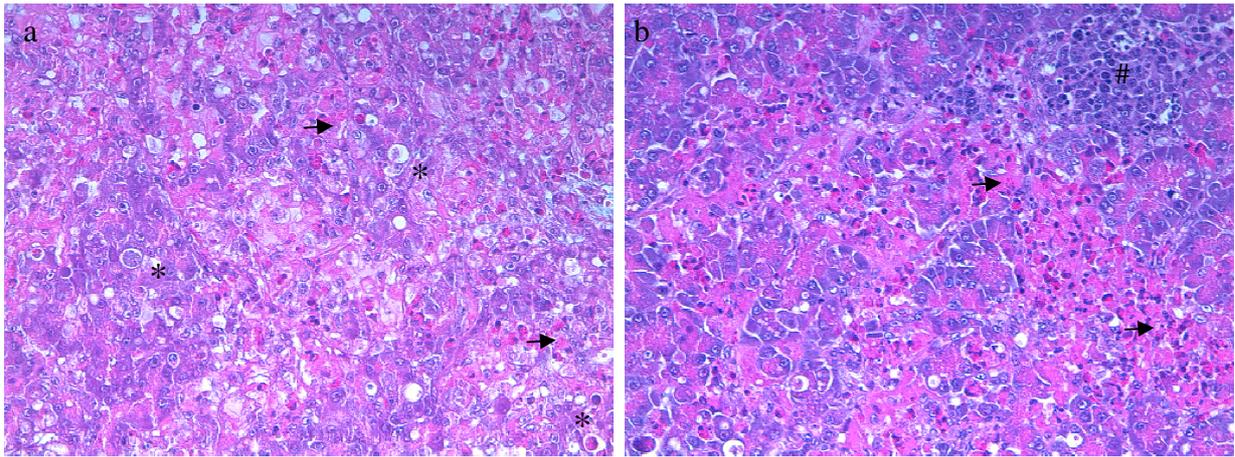


Figura 7: a, Tacchino, pancreas, 4 dpi, H&E, 40X: pancreatite acuta grave caratterizzata dalla presenza di aree di necrosi (*) e infiltrato infiammatorio eterofilico (freccia). b, Tacchino, pancreas, 4 dpi, H&E, 40X: pancreatite subacuta moderata con infiltrato infiammatorio eterofilico (freccia) e linfocitico (#).

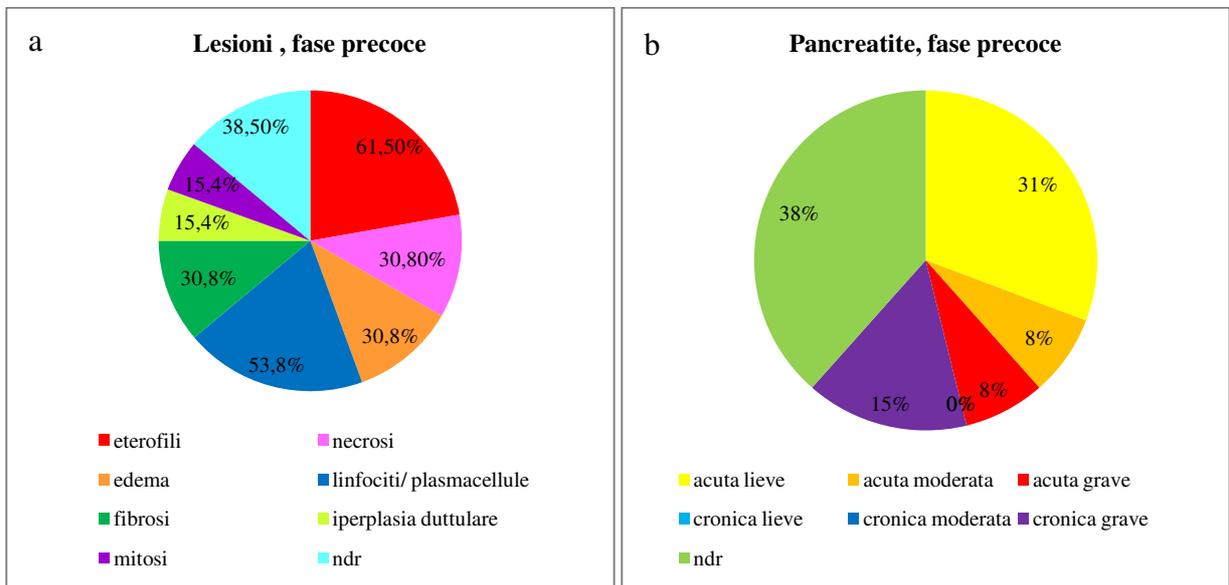


Figura 8: a, Lesioni pancreatiche osservate nella fase precoce; b, classificazione morfologica di pancreatite per stadio e intensità nella fase precoce

Riassumendo, nei 13 pancreas campionati durante la fase precoce, in base alle lesioni individuate, dal punto di vista morfologico si è potuto diagnosticare una pancreatite acuta lieve per quattro casi, mentre per tre casi è stata diagnosticata una pancreatite grave (Figura 8b). In particolare, uno di questi ultimi, prelevato a 4 dpi, ha presentato una pancreatite acuta necrotizzante molto grave, con estesa necrosi, edema marcato, infiltrato eterofilico grave e peripancreatite fibrinosa (Figura 7a). Un campione prelevato a 7 dpi, oltre a tali aspetti, ha mostrato anche infiltrato linfoplasmacellulare grave e fibrosi moderata, lesioni tipiche di infiammazione cronica. Infine, alcuni campioni hanno presentato contemporaneamente caratteri di infiammazione acuta (necrosi, edema ed eterofili) e cronica (linfociti e fibrosi) di entità moderata-grave (Figura 7b).

Nei campioni di pancreas prelevati durante la fase intermedia le lesioni infiammatorie sono prevalse sulla necrosi e si sono osservati segni di rigenerazione pancreatica quali l'iperplasia dei duttuli e le mitosi (Figura 10a). L'infiltrato infiammatorio era costituito sia da eterofili (in 7 casi su 9, 77,8%) sia da linfociti e plasmacellule (6/9, 66,7%), spesso presenti contemporaneamente. I linfociti erano spesso raggruppati in aggregati multifocali con tendenza alla coalescenza. La necrosi è stata presente in soli due campioni (22,2%). In uno di questi si è potuta notare anche la presenza di deposizione di matrice extracellulare eosinofila di origine non identificata (la colorazione rosso Congo ne ha escluso l'origine amiloide).

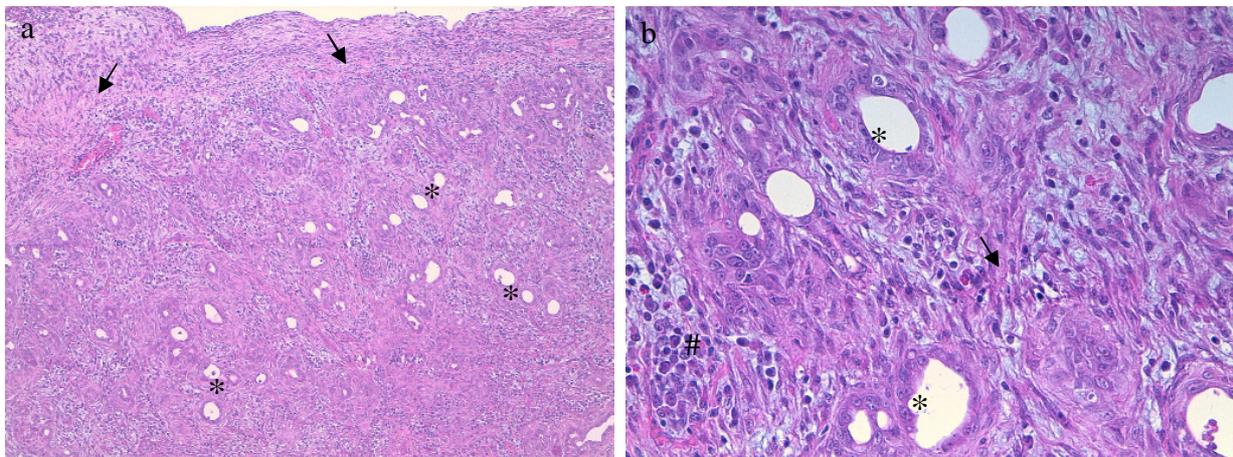


Figura 9: a, Tacchino, pancreas, 10 dpi, H&E, 10X, e b, tacchino, pancreas, 10 dpi, H&E,40X: pancreatiti croniche moderate con iperplasia duttulare (*), fibrosi grave (freccia) e sporadici linfociti (#).

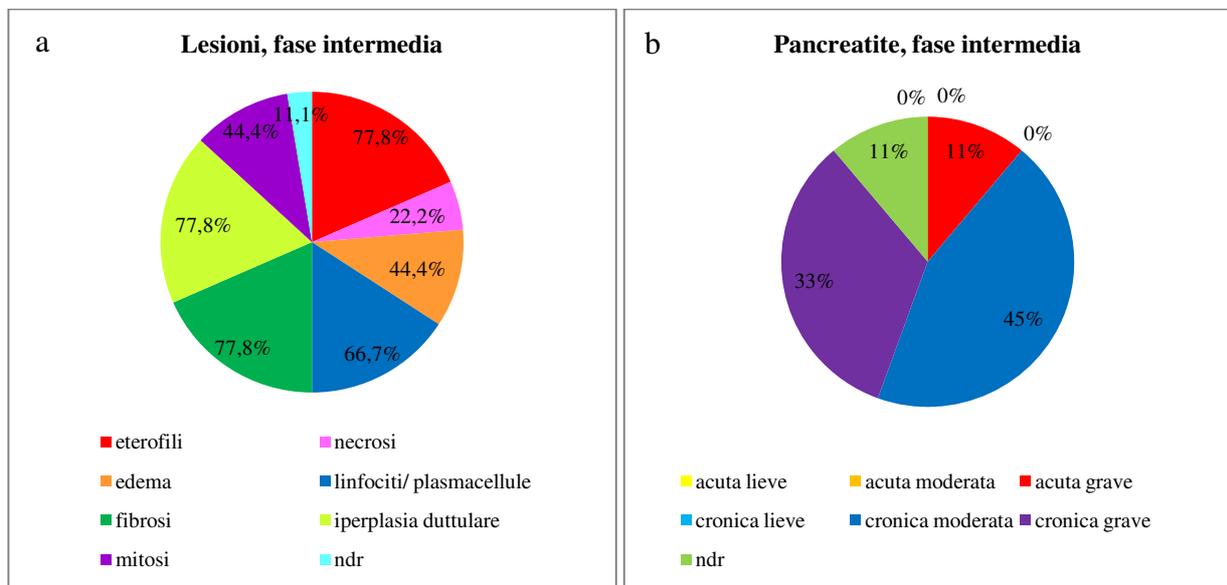


Figura 10: a, Lesioni pancreatiche osservate nella fase intermedia; b, classificazione morfologica di pancreatite per stadio e intensità nella fase intermedia.

In 7 campioni (77,8%) si è osservata fibrosi con deposizione da lieve a grave di fibre di collagene nell'interstizio e lobulazione dell'organo (Figura 9a). Nei casi gravi, le cellule degli acini pancreatici non sono più state riconoscibili o hanno conservato la normale morfologia solo in corrispondenza dei dotti poiché la fibrosi e l'infiltrato infiammatorio erano estesi al punto da rendere difficile mantenere la normale architettura dell'organo. Gli stessi campioni con segni di fibrosi hanno mostrato anche un'evidente e diffusa iperplasia dei dotti di piccolo calibro (7/9, 77,8%) (Figura 9b). Inoltre sono state segnalate mitosi disseminate nel pancreas esocrino (4/9, 44,4%). Soltanto uno dei pancreas analizzati prelevato durante la fase intermedia non ha presentato alcun tipo di lesione (11,1%).

Sulla base delle lesioni osservate nella fase intermedia del decorso dell'infezione, si è potuto formulare la diagnosi morfologica di pancreatite per 8 casi (Figura 10b). In tutti sono stati messi in evidenza caratteri infiammatori di stadio subacuto, più spostati verso un aspetto tipicamente cronico nei casi con pancreatite fibrosante. Ovunque l'entità del danno è stata moderata o grave. L'analisi istologica di tutti i 6 pancreas prelevati dai tacchini sacrificati durante la fase tardiva post infezione (39 dpi) ha mostrato una pancreatite cronica fibrosante (Figura 12b). Tutti hanno mostrato una componente cellulare infiammatoria di tipo linfoplasmacellulare di entità lieve o moderata. In 2 campioni (33,3%) sono risultati ancora presenti alcuni eterofili (Figura 12a). La fibrosi è stata presente in tutti i casi e, in due, ha assunto un'entità particolarmente grave: qui erano rimasti pochi acini di cellule esocrine isolati e circondati da una pesante deposizione di fibre collagene diffusa in tutto l'organo (Figura 11a). Vi si è associata la presenza di estesi aggregati di linfociti sia nel tessuto esocrino rimanente sia nell'interstizio (Figura 11b).

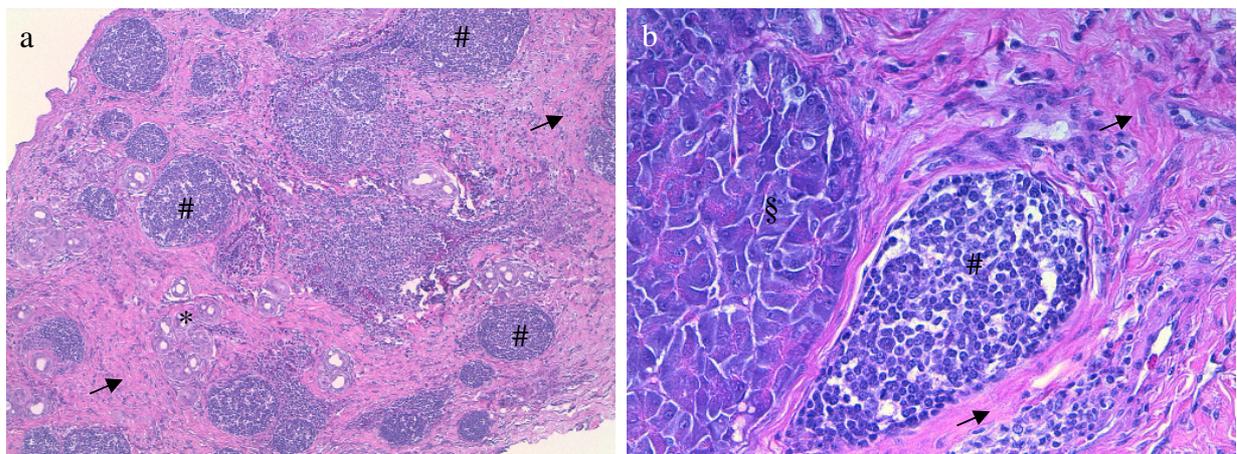


Figura 11: a, Tacchino, pancreas, 39dpi, H&E, 10X e b, tacchino, pancreas, 39 dpi, H&E, 40X: pancreatiti croniche gravi con ampi aggregati multifocali di linfociti (#), iperplasia dei dotti (*) e diffusa fibrosi grave (freccia); si osserva anche una porzione di parenchima esocrino normale (§).

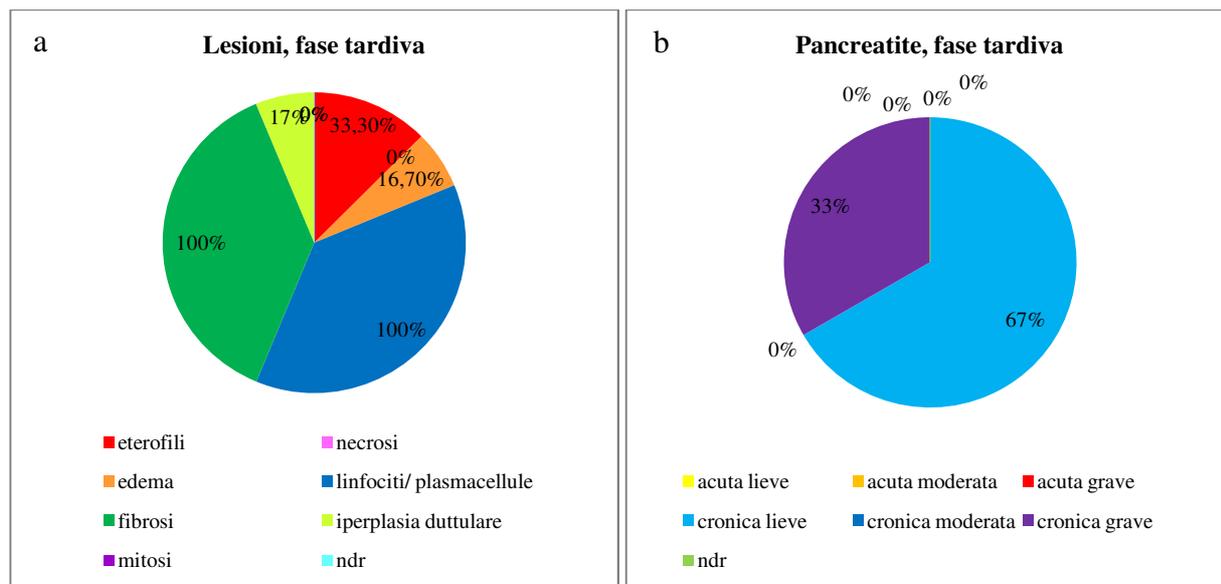


Figura 12: a, Lesioni pancreatiche osservate nella fase tardiva; b, classificazione morfologica di pancreatite per stadio e intensità nella fase tardiva.

L'analisi istologica eseguita non ha permesso di rivelare nei campioni analizzati la presenza di alterazioni patologiche che interessassero in maniera specifica le isole di Langerhans. Tuttavia tali isole non sono state chiaramente visibili in tutte le sezioni analizzate. I pancreas dei due tacchini di controllo non hanno mostrato lesioni rilevanti.

La fibrosi è stata ulteriormente indagata tramite la colorazione tricromica di Masson con blu di anilina delle sezioni. Mentre nei campioni colorati con H&E la deposizione di fibre collagene è stata evidente solo nei quadri avanzati di pancreatite fibrosante, la colorazione tricromica ha consentito di evidenziare anche quadri di fibrosi più lieve. Dopo colorazione tricromica, i fibroblasti si riconoscono dal citoplasma di colore rosso e dalla forma fusata. Producono e secernono i precursori del collagene, che è evidenziabile come una matrice extracellulare fibrillare di colore blu.

Otto casi su 28 (28,6%) hanno presentato una fibrosi lieve. In questi casi si è osservata la presenza diffusa di matrice blu disposta in fibrille molto sottili nell'interstizio tra le cellule del pancreas esocrino (Figura 13a). Diversamente, nei 4 casi con fibrosi grave (14,3%) osservati nella fase intermedia e nella fase tardiva la deposizione di collagene era marcata ed era evidente già in H&E. L'analisi dopo colorazione tricromica ha permesso la rilevazione di un grave ispessimento dei setti con suddivisione del parenchima in lobuli. Un'ampia superficie dell'organo è stata sostituita da tessuto fibroso, che è risultato essere più abbondante rispetto allo scarso tessuto acinoso pancreatico residuo (Figura 13c). La fibrosi era moderata in 5 casi

(17,9%) (Figura 13b) e assente in 11 casi (39,3%) (Figura 13d), appartenenti prevalentemente alla fase precoce. In tutti i campioni prelevati durante la fase tardiva era presente deposizione di collagene. Un campione della fase intermedia, che presentava in H&E un'abbondante matrice extracellulare eosinofila, dopo colorazione tricromica di Masson ha mostrato una matrice omogenea di colore violaceo non fibrillare a pattern multifocale.

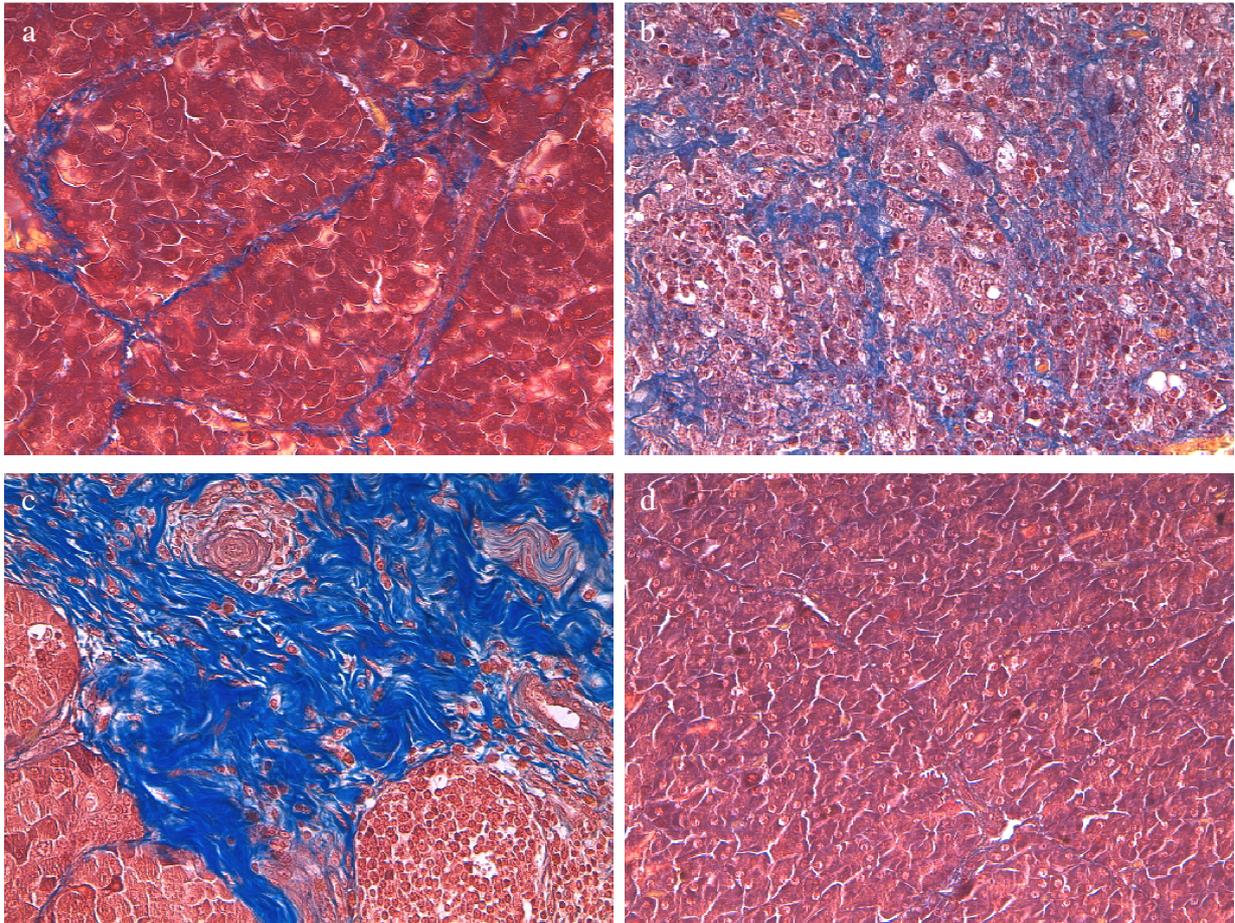


Figura 13: Tacchino, pancreas, tricromica di Masson, 40X. Esempi di fibrosi di grado: a, lieve (39 dpi); b, moderata (9 dpi); c, grave (39 dpi) e d, assente (controllo).

Le sezioni di pancreas sono state valutate secondo il metodo semiquantitativo proposto da De Cock per la pancreatite nel gatto con l'attribuzione di punteggi per le lesioni di stadio acuto (infiltrato eterofilico e necrosi ed edema) e di stadio cronico (infiammazione linfocitica, fibrosi e degenerazione cistica) e formulazione di diagnosi morfologica in base alla somma (De Cock et al., 2007). Nel presente lavoro ogni vetrino è stato valutato in H&E e in tricromica di

Masson sia per le lesioni acute sia per quelle croniche, essendo spesso presenti contemporaneamente.

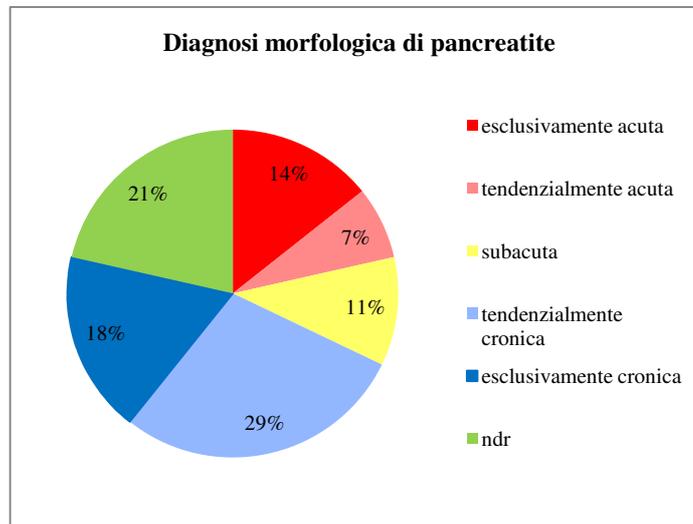


Figura 14: Diagnosi morfologica di pancreatite secondo lo schema proposto da De Cock et al., 2007.

Quattro casi non hanno presentato lesioni; a questi sono stati aggiunti anche i due casi in cui è stata osservata soltanto la presenza di piccoli aggregati di linfociti non considerata patologica. I campioni nei quali non sono state evidenziate lesioni sono stati 6 su 28 (21,4%). Quattro casi hanno mostrato esclusivamente i caratteri di pancreatite acuta (14,3%), tutti appartenenti al gruppo di tacchini sacrificati nella fase precoce dell'infezione. Cinque campioni hanno mostrato segni di pancreatite cronica (17,9%) e appartenevano tutti al gruppo sacrificato a 39 dpi, nella fase tardiva.

Tra i due estremi si sono collocati 13 campioni (46,4%) che hanno riportato contemporaneamente i diversi tipi di lesione utilizzati come parametro di punteggio. Al loro interno, comunque, spesso si è potuto riconoscere ugualmente un'inclinazione verso quadri prevalentemente acuti oppure cronici: alla prima eventualità sono stati riconducibili 2 campioni (tra la fase precoce e intermedia) e alla seconda 8 (più uniformemente distribuiti, ma concentrati nella fase intermedia) (Figura 14). I due casi di controllo non hanno mostrato segni di pancreatite.

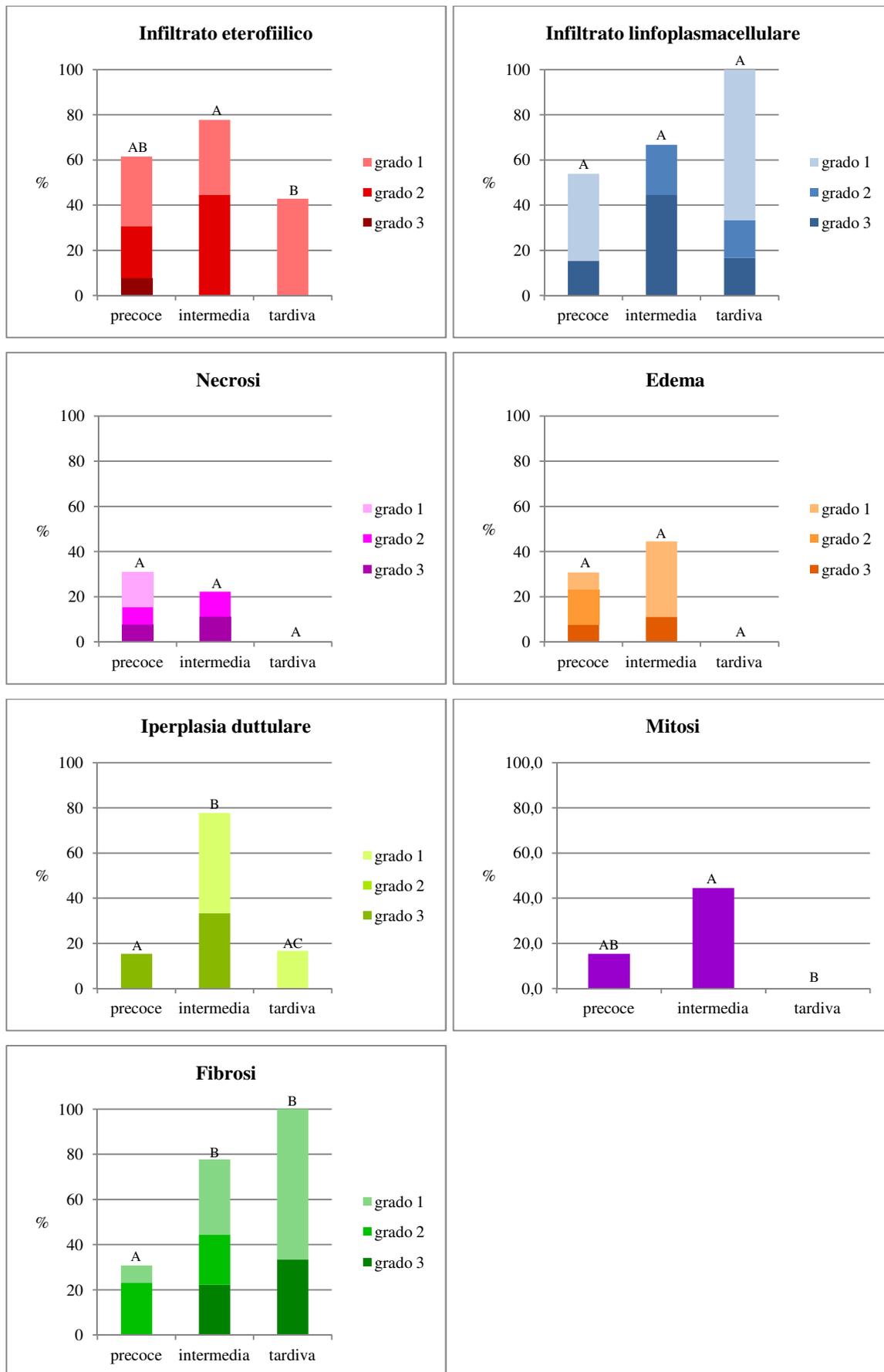


Figura 15: Percentuale di campioni interessata dalle lesioni per fase temporale e per gravità (1 = lieve, 2 = moderata, 3 = grave). Valori con lettere diverse hanno differenze statisticamente significative (Mann-Whitney test, $p \leq 0,05$).

4.3 ESAME IMMUNOISTOCHEMICO

4.3.1 IHC VIRUS

Allo scopo di identificare la presenza del virus influenzale nel tessuto pancreatico sono state eseguite delle analisi immunoistochimiche utilizzando un anticorpo contro la nucleoproteina NP del virus. Sei campioni su 28 (21,4%) sono risultati positivi. Quattro di questi campioni di pancreas erano stati prelevati da animali sacrificati a 4 e 7 dpi, quindi nella fase precoce dell'infezione, mentre gli altri due a 9 dpi, quindi nella fase intermedia (Tabella 9). L'immunoistochimica ha evidenziato che la positività era localizzata prevalentemente a livello nucleare e meno frequentemente a livello citoplasmatico all'interno delle cellule degli acini pancreatici. Le positività erano presenti sia in cellule acinose in necrosi sia in cellule disseminate all'interno del parenchima esocrino non ancora compromesso. Non sono state evidenziate positività al virus all'interno di cellule endocrine. I quattro campioni di pancreas prelevati da animali sacrificati nella fase precoce dell'infezione hanno mostrato una positività forte al virus ed erano associati a quadri di pancreatite acuta o subacuta grave all'esame istopatologico (Figure 16a e 16b). Uno dei due campioni di pancreas ottenuto da un animale sacrificato a 9 dpi, che all'analisi istologica presentava deposizione massiccia di un'insolita matrice extracellulare, ha mostrato una positività più moderata rispetto a quelli prelevati a 4 dpi. L'altro campione ottenuto da un animale sacrificato a 9 dpi, anche in questo caso con chiari segni di pancreatite grave, ha presentato una positività lieve. I pancreas che hanno mostrato positività al virus in immunoistochimica sono quelli che anche all'analisi molecolare hanno mostrato presenza del virus con valori soglia in RRT-PCR (Ct) più bassi. I controlli sono risultati sempre negativi alla ricerca di AIV.

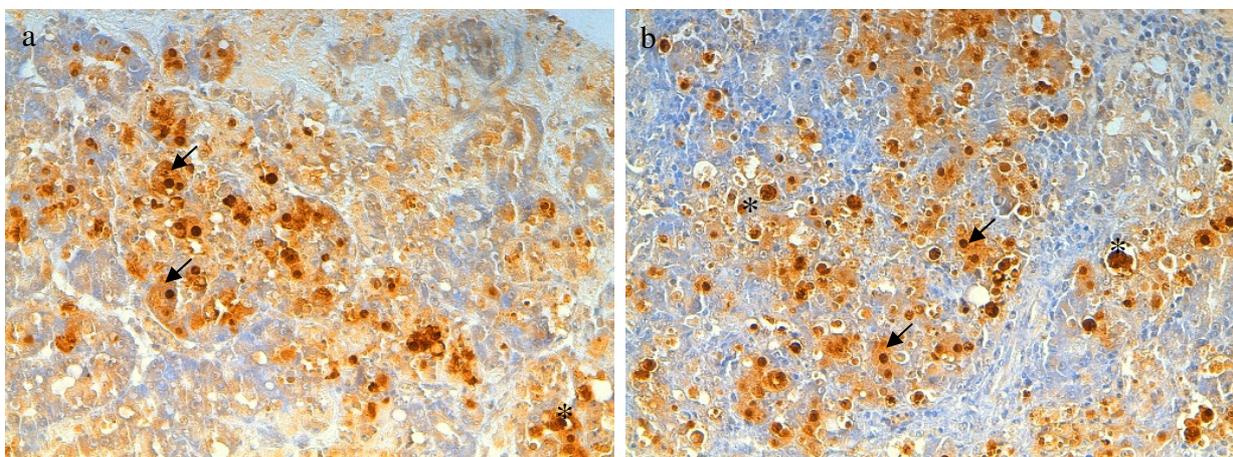


Figura 16: Tacchino, pancreas, a, 4 dpi e b, 7 dpi, colorazione immunoistochimica per AIV, 40X. Sono evidenti positività al virus a livello nucleare e citoplasmatico nelle cellule degli acini esocrini, sia necrotiche (*) sia illese (freccia).

Tabella 9: Positività agli esami IHC per virus influenzale (AIV), insulina e glucagone.

		Fase precoce		Fase intermedia		Fase tardiva	
Esame IHC	AIV	4/13	30,8%	2/9	22,2%	0/6	0%
	insulina	13/13	100%	9/9	100%	6/6	100%
	glucagone	13/13	100%	8/9	88,9%	6/6	100%

4.3.2 IHC INSULINA E GLUCAGONE

Tramite colorazione immunoistochimica è stata valutata l'espressione di insulina e di glucagone per valutare un possibile coinvolgimento patologico del pancreas endocrino alla luce dell'iperglicemia riscontrata. Tutti i campioni di pancreas ottenuti dai 28 animali infettati con virus LPAI H7 hanno mostrato positività all'insulina, mentre 27 animali hanno mostrato positività al glucagone (27/28, 96,4%) (Tabella 9).

Ad una prima valutazione qualitativa sono emerse alcune disomogeneità nell'organizzazione spaziale e nella distribuzione delle cellule endocrine positive, motivo per cui è stata effettuata anche un'analisi morfometrica. Per ciascun campione sono stati analizzati 10 campi, anche se non in tutti i vetrini è stato possibile delineare tale numero di elementi positivi. In totale sono stati contati 4360 elementi positivi per il glucagone in 229 campi e 1914 elementi positivi per insulina in 285 campi.

La distribuzione del glucagone è apparsa piuttosto disomogenea nei diversi campioni. In alcuni campioni, soprattutto di casi appartenenti alla fase precoce e intermedia, le positività sono state poche e rappresentate da singole cellule disseminate (Figura 17a1). In un caso, nel quale è stata riscontrata pancreatite acuta grave, non si è trovata nessuna cellula positiva. Nei campioni a 39 dpi, invece, si è osservata una modalità di organizzazione più varia, anche con isole pancreatiche di dimensioni particolarmente ampie, spesso localizzate nell'interstizio circondate da tessuto fibroso (Figura 17a3). Inoltre, è stato interessante notare che nei casi con iperplasia dutturale si sono osservate cellule positive all'interno dell'epitelio dei dotti così come piccoli aggregati cellulari nelle immediate vicinanze (Figura 17a2).

All'analisi quantitativa, i gruppi glucagone-positivi sono risultati numerosi e con prevalenza di elementi di dimensioni piccole che corrispondevano a cellule singole disseminate (Figura 18).

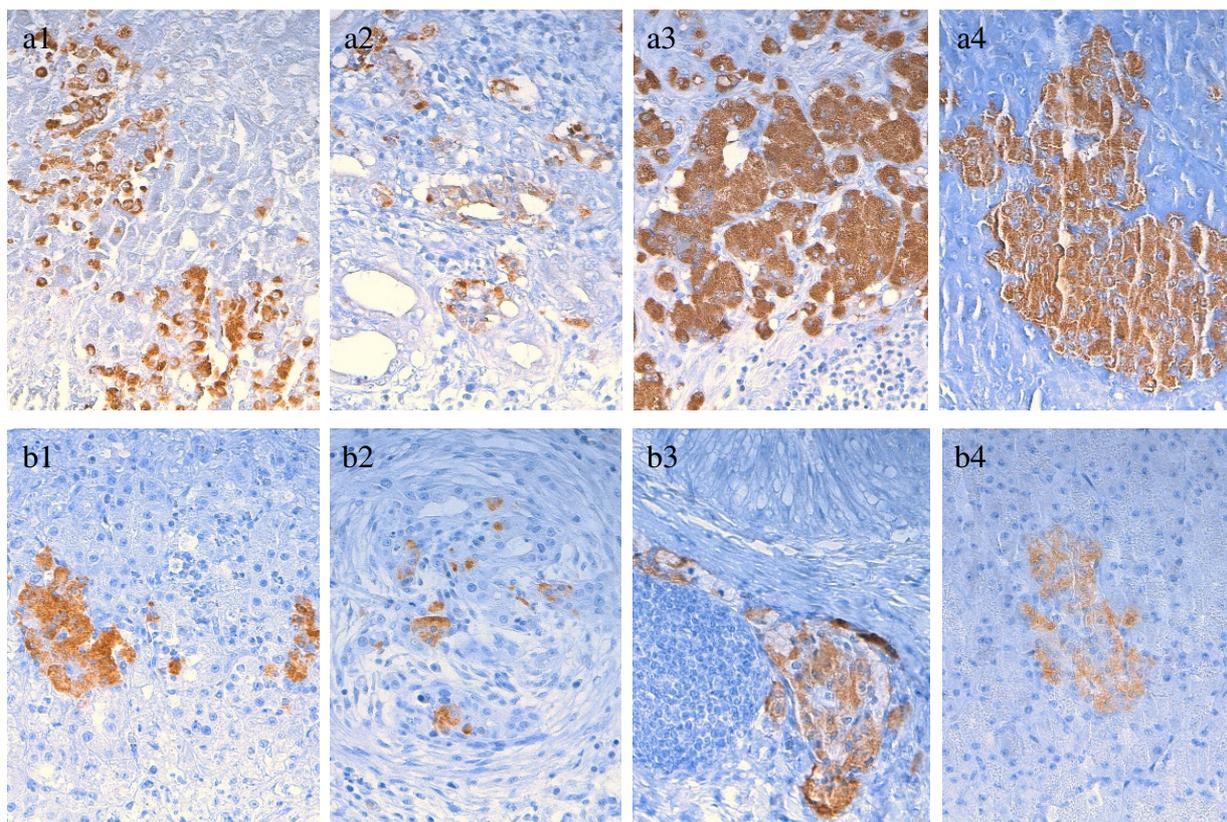


Figura 17: Tacchino, pancreas, colorazione immunohistochemica per a, glucagone e b, insulina, 40X. Campioni rappresentativi di isole pancreatiche nel decorso post-infettivo: 1, fase precoce; 2, fase intermedia; 3, fase tardiva; 4, controllo.

In relazione alle fasi temporali del decorso post-infettivo, le dimensioni medie delle superfici positive sono state $528,51 (\pm 334,15) \mu\text{m}^2$ nei pancreas della fase precoce, $229,23 (\pm 86,36) \mu\text{m}^2$ nella fase intermedia e $719,93 (\pm 354,26) \mu\text{m}^2$ nella fase tardiva. Le dimensioni medie delle aree glucagone-positivo del gruppo di controllo sono state $1032,89 (\pm 429,87) \mu\text{m}^2$ (Figura 19a). Il confronto tra i quattro gruppi costituiti dalle tre fasi post-infettive e dai controlli ha mostrato una differenza statisticamente significativa tra la fase intermedia e gli altri gruppi ($p = 0,036$ rispetto alla fase precoce, $p = 0,005$ rispetto alla fase tardiva e $p = 0,005$ rispetto ai controlli).

È stata inoltre calcolata in percentuale la superficie rivestita dalle aree glucagone-positivo sul totale della sezione: è stata $0,59\%$ nella fase precoce, $0,61\%$ nella fase intermedia e $2,27\%$ nella fase tardiva. Nel gruppo di controllo è stata $0,90\%$ (Figura 19b). L'analisi dei dati ha dimostrato che la positività della fase tardiva è stata differente dalla fase precoce ($p = 0,005$) e dalla fase intermedia ($p = 0,009$) in maniera statisticamente significativa.

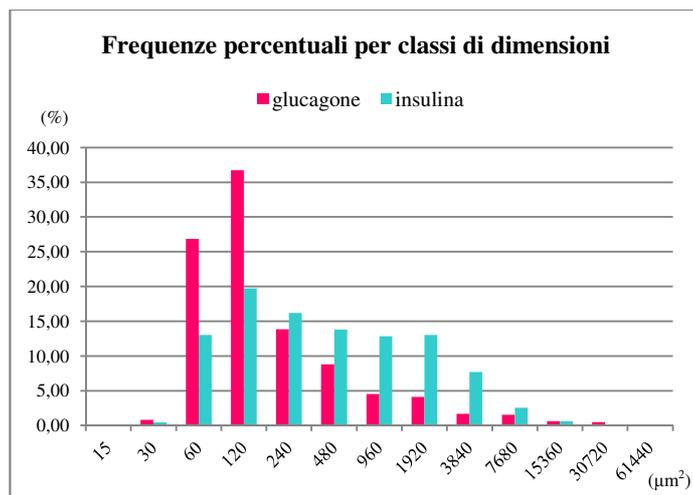


Figura 18: Istogramma di frequenze percentuali di distribuzione degli elementi positivi per glucagone e insulina per classi di dimensioni.

Alla valutazione qualitativa gli elementi insulino-positivi sembravano avere distribuzione più omogenea rispetto al glucagone (Figura 17b). In generale sono stati meno numerosi e di dimensioni maggiori, a causa della prevalenza di vere e proprie isole piuttosto che di cellule singole (Figura 18). È sembrato che l'insulina fosse secreta in maniera più omogenea rispetto al glucagone nel periodo post-infezione. Tuttavia anche per l'insulina nei pancreas a 39 dpi si sono osservate isole di dimensioni molto ampie, soprattutto nell'interstizio fibroso, mentre nei campioni con iperplasia duttare si sono osservate cellule positive nell'epitelio duttare e nelle vicinanze.

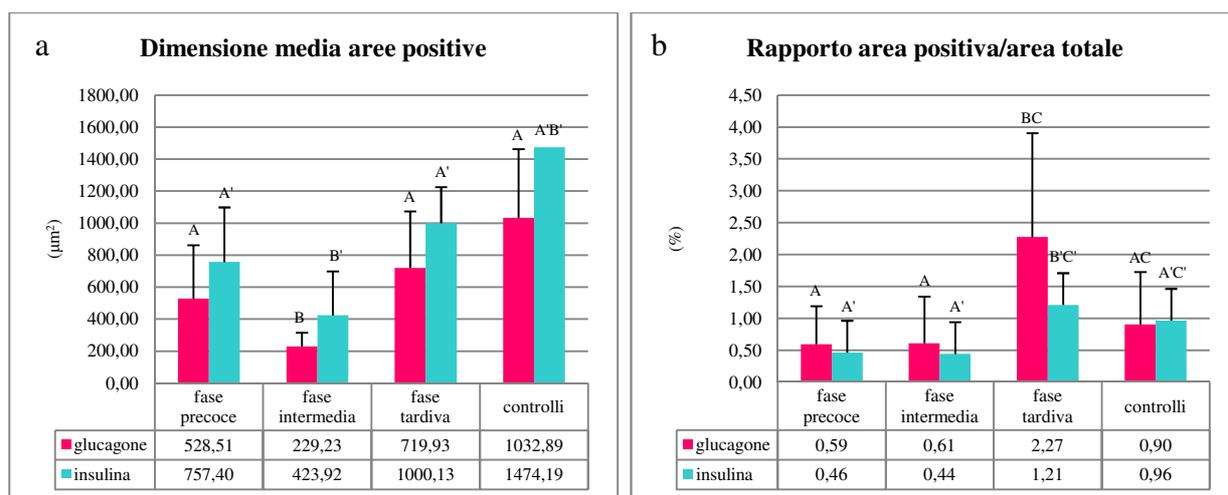


Figura 19: Dati morfometrici in relazione alle fasi temporali. a, Dimensioni medie delle aree positive per glucagone e insulina in μm^2 ; b, rapporto delle superfici positive per glucagone e insulina sulle superfici totali in %. I risultati sono espressi come valori medi + deviazione standard. Valori con lettere diverse hanno differenze statisticamente significative (Mann-Whitney test, $p \leq 0,05$).

La dimensione media delle aree positive all'insulina e la superficie positiva sul totale sono state rispettivamente $757,40 (\pm 341,32) \mu\text{m}^2$ e $0,46\%$ nella fase precoce, $423,92 (\pm 275,17) \mu\text{m}^2$ e $0,44\%$ nella fase intermedia, $1000,13 (\pm 225,82) \mu\text{m}^2$ e $1,21\%$ nella fase tardiva. Nei controlli la dimensione media è stata $1474,19 \mu\text{m}^2$ e la superficie positiva è stata lo $0,96\%$. Come già per il glucagone, la fase intermedia ha mostrato dimensioni medie statisticamente diverse dagli altri gruppi ($p = 0,003$ sia nei confronti della fase precoce sia nei confronti della fase tardiva) (Figura 19a) e la fase tardiva ha registrato una più alta percentuale di positività ($p = 0,001$ nei confronti della fase precoce e $p = 0,018$ nei confronti della fase intermedia) (Figura 19b).

I dati morfometrici sono stati analizzati anche in relazione al tipo di diagnosi morfologica (pancreatiti acute / pancreatiti croniche / nessun danno) e, ulteriormente, alla classe di gravità del danno (lieve / moderato / grave). Sia glucagone che insulina hanno mostrato differenze statisticamente significative nelle dimensioni medie delle isole (Figura 20a) e nelle percentuali di positività (Figura 20b) nel confronto tra sottogruppi o rispetto al tessuto pancreatico normale. In particolare, per quanto riguarda il rapporto delle aree positive sulle superfici totali, per il glucagone: $p = 0,021$ tra pancreatite acuta lieve e tessuto normale, $p = 0,04$ tra pancreatite acuta grave e tessuto normale; per l'insulina: $p = 0,038$ tra pancreatite acuta lieve e tessuto normale, $p = 0,021$ tra pancreatite acuta lieve e pancreatite cronica lieve, $p = 0,043$ tra pancreatite cronica lieve e pancreatite cronica moderata.

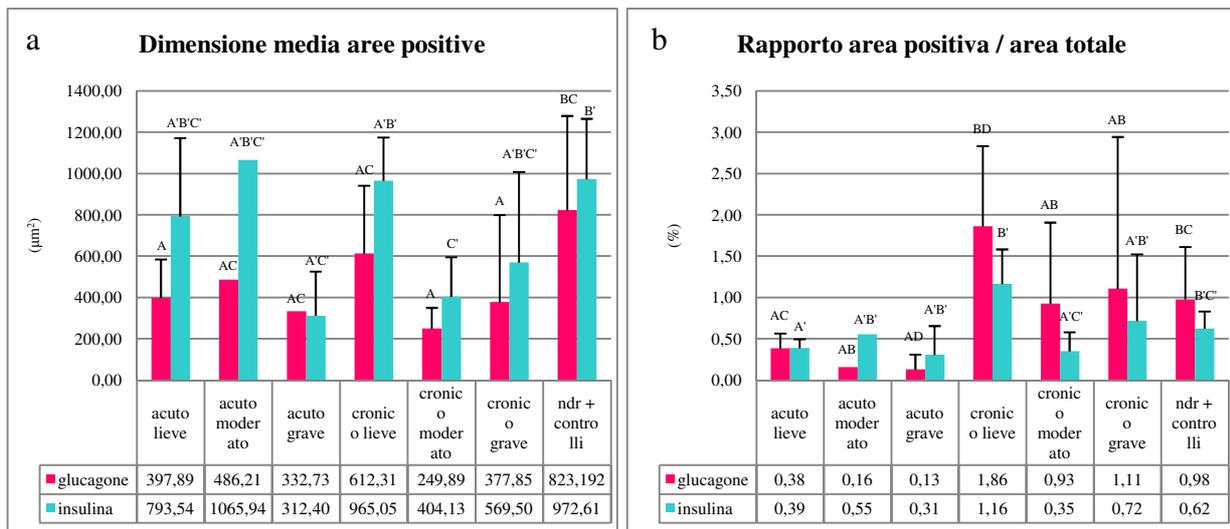


Figura 20: Dati morfometrici in relazione alle diagnosi morfologiche per stadio e gravità. a, Dimensioni medie delle aree positive per glucagone e insulina in μm^2 ; b, rapporto delle superfici positive per glucagone e insulina sulle superfici totali in %. I risultati sono espressi come valori medi + deviazione standard. Valori con lettere diverse hanno differenze statisticamente significative (Mann-Whitney test, $p \leq 0,05$).

5. DISCUSSIONE

In questo lavoro di tesi sono state analizzate le lesioni pancreatiche presenti in tacchini infettati sperimentalmente con virus influenzali aviari LPAI H7 sacrificati in un periodo compreso tra il quarto ed il trentanovesimo giorno post infezione. Nella maggior parte dei pancreas analizzati sono state evidenziate caratteristiche tipiche della pancreatite. Quello che si è evidenziato è che tali lesioni sono cambiate lungo il periodo di osservazione con uno spostamento graduale ma netto da una pancreatite necrotizzante acuta verso una pancreatite fibrosante cronica. In questo lavoro sono state distinte tre diverse fasi post infezione, precisamente:

- 1) una fase precoce (4-7 dpi), che è stata caratterizzata prevalentemente da necrosi, edema e infiltrato infiammatorio eterofilico. Il quadro istopatologico è successivamente cambiato mostrando caratteristiche subacute nell'arco di pochi giorni, con l'aggiunta di nuove popolazioni cellulari infiammatorie come i linfociti, perlopiù presenti come aggregati multifocali, e le plasmacellule;
- 2) una fase intermedia (8-17 dpi), nella quale sono stati evidenziati interessanti elementi di rigenerazione tissutale, rappresentati principalmente dall'iperplasia di dotti di piccolo calibro, dall'aumentato numero delle mitosi e dalla fibrosi;
- 3) una fase tardiva (39 dpi), in cui gli elementi costanti e caratterizzanti sono stati la presenza di fibrosi da lieve a grave e di infiltrato linfoplasmacellulare.

Solo pochi campioni di pancreas appartenenti alla fase precoce non sono stati apparentemente colpiti dall'infezione ed hanno mostrato un aspetto normale del tessuto. Questo potrebbe essere dovuto al fatto che il virus non aveva ancora raggiunto il pancreas. I campioni pancreatici della fase precoce presentavano gravi e diffuse lesioni necrotiche e infiammatorie con distruzione del parenchima esocrino e perdita dell'aspetto normale del tessuto. I campioni di pancreas appartenenti a questa fase hanno esibito un'ampia varietà di lesioni e spesso il tipo di lesione prevalente è stata diversa di sezione in sezione. La necrosi ha colpito gli acini pancreatici esocrini con estensione da multifocale a diffusa, mentre gli eterofili, frequentemente presenti, sono stati osservati soprattutto in sede periduttale e perivascolare. Già nella transizione dai 4 ai 7 dpi è emersa una evoluzione nel tipo di lesioni, con l'introduzione di nuove popolazioni cellulari (linfociti e plasmacellule) e la comparsa dei primi casi di fibrosi lieve. L'aspetto di

distruzione del pancreas esocrino ha quindi lasciato spazio a caratteri di riparazione tissutale nei campioni pancreatici descritti nella fase intermedia post infezione. È stato descritto un fenomeno di iperplasia dei dotti di piccolo calibro ed è stata annotata la presenza di un elevato numero di mitosi. Nella maggior parte dei casi è anche stata osservata fibrosi, che rappresenta l'inizio del processo di riparazione per sostituzione delle cellule del parenchima con il tessuto connettivo. La fibrosi ha colpito la totalità dei campioni appartenenti alla fase tardiva. Tutti i pancreas campionati a 39 dpi, infatti, hanno mostrato un quadro delle lesioni omogeneo: in tutti è stata descritta una pancreatite cronica con presenza di fibrosi e di infiltrato linfoplasmacellulare. La deposizione di tessuto connettivo è stata in alcuni casi tanto ingente e diffusa da superare in estensione il parenchima esocrino residuo fino a costituire la maggior parte della superficie della sezione. I linfociti sono stati descritti soprattutto sotto forma di ampi aggregati multifocali nettamente distinti dal tessuto circostante, sia all'interno del parenchima esocrino residuo sia all'interno del tessuto connettivo depositato.

Durante l'intero periodo di osservazione, l'analisi morfologica non sembra avere evidenziato lesioni patologiche specificamente a carico delle cellule insulari. Non sempre è stato possibile distinguere le isole di Langerhans dopo colorazione con H&E, mentre le colorazioni immunoistochimiche per glucagone e insulina hanno evidenziato fenomeni prima di dissociazione e poi di iperplasia delle isole stesse.

All'inizio del periodo post-infettivo si sono potuti osservare tutti i tipi di lesione complessivamente descritti poiché i quadri istolesivi erano piuttosto variegati tra i diversi campioni, sia per tipo di danno sia per gravità. Nelle fasi più avanzate, invece, si è notata una tendenza verso un'uniformità nell'aspetto dei campioni osservati e verso l'emergere di alcuni tipi di lesioni come caratteristici del periodo. È stato il caso dell'iperplasia dei dotti di piccolo calibro nella fase intermedia e della fibrosi nella fase tardiva. L'analisi statistica ha confermato che sono esistite differenze significative nella presenza di fibrosi tra le fasi intermedia e tardiva da una parte e la fase precoce dall'altra così come sono emerse differenze statisticamente significative nella presenza di iperplasia dutturale tra la fase intermedia e gli altri due sottogruppi. Questo suggerisce che il pancreas sia prima sottoposto ad una gamma ampia di stimoli lesivi che possono colpire in modo anche molto grave il parenchima esocrino e che successivamente mostri invece capacità rigenerativa, che si ritrova in maniera omogenea nelle sezioni osservate nelle fasi più avanzate.

Oltre a valutare qualitativamente ogni campione pancreatico analizzato, si è proceduto con un'analisi secondo il metodo proposto da De Cock e colleghi al fine di adottare un metodo di giudizio di tipo semiquantitativo (De Cock et al., 2007). Il sistema sfrutta l'attribuzione di

punteggi ad alcuni parametri caratteristici di infiammazione acuta e di infiammazione cronica e formula una diagnosi sulla base della somma degli stessi. È stato originariamente ideato per la diagnosi istopatologica di pancreatite nel gatto, dove i caratteri di pancreatite acuta valutati sono l'infiammazione neutrofilica e la necrosi e l'edema, mentre i parametri di pancreatite cronica considerati sono l'infiammazione linfocitica, la fibrosi e la degenerazione cistica (De Cock et al., 2007). Il metodo è stato da noi adattato allo scopo di adeguarlo alla specie animale considerata e di mantenere la discriminazione tra le tre classi di gravità di pancreatite (lieve, moderata e grave) in base a quanto osservato. Poiché la discriminazione tra le classi di gravità si basava sull'estensione della lesione valutata, intesa come percentuale d'interessamento del parenchima, i limiti percentuali sono stati rivisti utilizzando come limite di riferimento i casi con i quadri più gravi. Inoltre, non avendo mai osservato la degenerazione cistica, altro parametro presente nello schema originale, si è scelto di non includerla come criterio di giudizio nell'attribuzione del punteggio. Gli eterofili sono stati considerati al pari dei granulociti neutrofili poiché ne costituiscono il corrispettivo nelle specie aviari. In più la presenza di plasmacellule è stata aggiunta come parametro d'infiammazione cronica e le plasmacellule sono state considerate assieme ai linfociti. I risultati della valutazione semiquantitativa della pancreatite con il metodo di De Cock ha confermato la presenza di una transizione da una pancreatite acuta verso una pancreatite cronica durante il periodo di osservazione.

L'utilizzo della biologia molecolare ha permesso di evidenziare la presenza del virus nella maggior parte dei campioni analizzati tramite RRT-PCR. Inoltre mediante RRT-PCR è stata evidenziata la presenza del virus anche in tutti i tamponi tracheali, come atteso dopo un'infezione con LPAI. Complessivamente il virus è stato individuato nel 39,3% degli animali infettati.

La maggior parte dei pancreas analizzati ha mostrato i segni di un processo infiammatorio grave in atto. La pancreatite necrotizzante è una caratteristica anatomopatologica frequente nel caso d'infezione da parte di virus influenzali ad alta patogenicità (HPAI) a causa della loro replicazione sistemica (van Riel et al., 2009). Tuttavia i virus utilizzati per l'infezione degli animali nel presente lavoro erano dei patotipi a bassa patogenicità (LPAI). I virus LPAI di solito non danno viremia e sono caratterizzati dalla replicazione del virus in sede locale, negli apparati respiratorio e enterico, poiché la sequenza amminoacidica del sito di *cleavage* del precursore della proteina HA ne consente il riconoscimento soltanto da parte di proteasi endogene extracellulari presenti in questi distretti dell'ospite (Alexander, 2007). Negli organi da noi analizzati, il pancreas è stato ugualmente raggiunto dal virus influenzale aviare. La

presenza del virus è stata confermata in alcuni campioni dalla RRT-PCR eseguita sul tessuto e dalla colorazione immunoistochimica per il virus fatta sulle sezioni. Le analisi con metodiche di biologia molecolare sono state eseguite in un sottogruppo di campioni: la RRT-PCR ha rivelato la presenza del virus influenzale nella maggior parte dei pancreas fino al decimo giorno. I casi con valori soglia (Ct) più bassi, ovvero quelli nei quali era presente la quantità maggiore di virus, sono quelli che hanno mostrato anche positività all'IHC per il virus. È interessante che il virus sia stato trovato anche nel sangue, suggerendo la possibilità che anche i virus a bassa patogenicità possano dare viremia.

L'IHC è stata eseguita su tutte le sezioni di pancreas. Soltanto un numero limitato di casi ha mostrato una reazione positiva per la presenza dell'antigene virale, tutti appartenenti al gruppo di animali sacrificati durante la fase precoce di infezione o all'inizio della fase intermedia, tra 4 dpi e 9 dpi. L'analisi immunoistochimica ha rivelato positività sia all'interno delle cellule acinose in necrosi sia nel circostante parenchima ancora illeso, in associazione a quadri morfologici di pancreatite grave. Questo studio ha permesso di individuare il giorno 9 post infezione come il *cut off* oltre il quale la nucleoproteina virale non è più rilevabile. Non è stato possibile osservare positività nel pancreas endocrino, perciò, stando ai nostri risultati, non sembra possibile affermare che possa costituire un target di replicazione specifico del virus.

Le lesioni osservate sono del tutto simili per i sottotipi LPAI H7N1 e H7N3 (Capua et al., 2013). Le caratteristiche cliniche e istopatologiche dell'infezione di tipo sperimentale sono simili a quanto osservato durante le infezioni di campo descritte durante le epidemie italiane nei tacchini negli anni 1999-2001 e 2002-2004 (Capua et al., 2000; Cattoli et al., 2003). La pancreatite, infatti, è stata un reperto costante durante i focolai di influenza a bassa patogenicità italiani. Come questi, sono stati segnalati casi d'infezioni in cui, oltre ai tratti respiratorio e enterico, anche altri organi sono stati coinvolti dall'infezione con virus LPAI. Ad esempio, oltre ai fenomeni italiani, un virus influenzale a bassa patogenicità è stato isolato dal pancreas, così come da altri organi, durante un focolaio d'infezione naturale nei polli in Giappone (Okamatsu et al., 2007). Anche un progetto con infezione sperimentale LPAI di pulcini ha rilevato l'insorgere di una pancreatite necrotizzante in assenza di ostruzioni duttali e in presenza del virus in attiva replicazione negli acini. Questo ha suggerito agli autori la possibilità che il virus LPAI possa avere un effetto citolitico diretto e anche che possa dare viremia, vista la presenza dell'antigene nell'endotelio (Shinya et al., 1995). Al di fuori del campo aviare, anche l'influenza umana H1N1 è stata in grado di dare viremia in alcuni pazienti (Oughton et al., 2011) e questo è stato considerato come un indicatore della gravità della malattia con valenza prognostica (Tse et al., 2011).

Si ipotizza pertanto che il virus possa essere in grado di raggiungere il pancreas tramite il torrente circolatorio o tramite il reflusso dall'intestino (Capua et al., 2013). Una volta raggiunto il pancreas, il virus troverebbe un corredo enzimatico ideale per la sua attivazione grazie alla presenza di trispina che, una volta attivata e rilasciata, potrebbe facilitare l'esposizione dei siti di *cleavage* dell'emoagglutinina (Nili et al., 2008; Capua et al., 2013).

La maggior parte dei tacchini ha avuto una pancreatite istologicamente anche grave a fronte di un quadro clinico con sintomatologia lieve. La pancreatite è di solito una patologia molto dolorosa: gli uccelli con pancreatite possono manifestare sintomi indicativi di dolore con comportamenti insoliti come beccarsi l'addome e le penne e con segni gastrointestinali come la diarrea e la perdita di peso (Doneley, 2001). Inoltre pancreatiti anche lievi possono portare ad una risposta infiammatoria sistemica (Watson, 2005). In caso di influenza a bassa patogenicità la pancreatite potrebbe essere capace di aggravare il quadro clinico con una potenziale ripercussione sull'accrescimento e sulle performance produttive degli animali, come dimostrato da Shinya e colleghi negli studi su pulcini con LPAI (Shinya et al., 1995). I tacchini di questo progetto manifestavano l'insieme di sintomi influenzali tipici di LPAI, con depressione, sinusite, congiuntivite e diarrea. Non potendo definire se tra questi ci fossero segni clinici imputabili in maniera specifica alla sofferenza pancreatica in atto, come indicatore della funzionalità pancreatica esocrina è stata valutata la concentrazione delle lipasi ematiche.

Le analisi svolte sui sieri di un gruppo di tacchini hanno rivelato che in un numero limitato di casi si è verificato un aumento delle lipasi una settimana dopo l'infezione. In pochi animali si è osservato anche un rialzo della glicemia nelle analisi svolte a due settimane. In entrambi i casi gli aumenti sono stati transitori e i valori sono rientrati nei range fisiologici alle analisi della settimana successiva. In due animali l'iperglicemia transitoria ha seguito l'aumento delle lipasi. Le lipasi erano molto aumentate nei sieri prelevati in animali a 7 dpi. I pancreas campionati nella fase precoce per l'esame istopatologico si trovavano nello stesso stadio di decorso postinfettivo di questi animali senza sviluppare essi stessi un rialzo della lipasemia. È presumibile supporre che possano comunque fornire un'idea indicativa del quadro anatomopatologico sottostante alle alterazioni ematobiochimiche. Istologicamente questi pancreas erano caratterizzati dalla presenza di pancreatite acuta/subacuta. Questi campioni mostravano lesioni tipiche della fase precoce con la presenza di necrosi e di infiammazione (soprattutto eterofilica) che hanno portato alla distruzione del parenchima esocrino. Un simile danno al pancreas esocrino è in grado di giustificare l'iperlipasemia, condizione potenzialmente reversibile (Watson, 2005). Nei test svolti a 14 dpi le concentrazioni di lipasi erano rientrate nei range fisiologici. I due animali a 17 dpi, la cui lipasemia aveva avuto un significativo rialzo alla

prima settimana per poi abbassarsi alla seconda, erano quelli in cui i campionamenti pancreatici erano stati fatti nel momento più vicino a questo secondo test: nei preparati istologici si vedevano quadri moderati/gravi di pancreatite cronica con infiltrato infiammatorio misto, fibrosi e iperplasia duttulare. L'abbassamento delle lipasi si potrebbe quindi giustificare perché l'epitelio non è più necrotico ma in fase di riparazione. Tuttavia i test catalitici misurano i livelli plasmatici di enzimi attivi e nelle pancreatiti croniche, a causa della riduzione di massa pancreatica, può anche esserci una riduzione della produzione complessiva di enzimi (Watson, 2005).

Al termine della seconda settimana in qualche animale si è osservato un aumento della glicemia di carattere transitorio. Per indagarne meglio le origini e le correlazioni con l'aspetto istologico è stata sfruttata la colorazione immunoistochimica per l'insulina e per il glucagone e l'analisi morfometrica degli elementi positivi. Non essendoci pancreas campionati a 14 dpi (giorno del testato rialzo glicemico) possiamo solo osservare le sezioni che riflettono una condizione di poco precedente (dai due tacchini a 10 dpi, che non hanno fatto in tempo ad essere testati) o di poco successiva (dai due 17 dpi, le cui glicemie erano comunque normali). I due pancreas a 10 dpi hanno mostrato positività numericamente scarse rappresentate da cellule singole o da piccoli aggregati frammentati, talvolta anche presenti in alcune cellule dei dotti, mentre a 17 dpi si sono osservate isole di dimensioni grandi, sia per insulina sia per glucagone, spesso circondate da tessuto fibroso. Il periodo della seconda settimana di infezione rientra in quella che è stata riconosciuta come fase intermedia. È interessante notare che in questa fase, sia per l'insulina che per il glucagone, a fronte di una percentuale di positività complessiva non diversa dalla fase precoce e dai controlli, è stata osservata una dissociazione delle isole positive distribuite come elementi non organizzati spazialmente di piccole dimensioni. Si può dedurre che una tale disorganizzazione del tessuto endocrino sia correlata allo squilibrio metabolico e che questo possa portare alla manifestazione di iperglicemia come accaduto in alcuni animali.

Le isole A, principalmente glucagone-secernenti, di solito hanno maggiori dimensioni e densità cellulare delle isole B, quelle deputate alla produzione di insulina. Le isole B hanno distribuzione più uniforme nei lobi pancreatici (Hazelwood, 2000) rispetto alle isole A, prevalenti in modo tipico nei lobi splenico e terzo (Mikami e Ono, 1962). Anche dalle nostre analisi morfometriche le cellule glucagone-secernenti sono risultate le più numerose, ma sono prevalse le isole piccole e le cellule singole, mentre gli elementi insulina-positivi sono stati meno numerosi ma di dimensioni maggiori. Sebbene il pancreas aviario abbia una caratteristica distribuzione delle isole legata all'anatomia dell'organo, il fatto che i campionamenti siano stati

svolti con criterio di casualità non permette di sapere se la zona di prelievo possa avere avuto un effetto sulla distribuzione delle positività per insulina e glucagone.

Le IHC hanno mostrato importanti disomogeneità nella distribuzione delle cellule positive e un'ampia varietà nell'organizzazione degli elementi positivi. In particolare, analizzando le dimensioni delle isole in relazione allo stadio temporale, nei campioni della fase intermedia gli elementi positivi erano più frammentati con prevalenza di cellule singole piuttosto che di isole organizzate (soprattutto per le cellule glucagone-secerenti). Al contrario nei pancreas a 39 dpi si è osservata un'organizzazione delle cellule endocrine molto variabile, talvolta anche con isole iperplastiche. Le cellule insulina-positiva hanno invece mostrato una distribuzione più uniforme nel tempo, con elementi meno numerosi ma di dimensioni maggiori. L'irregolarità nella distribuzione, nelle dimensioni e nell'organizzazione del tessuto insulare nella fase tardiva insieme ad un generale aumento nella percentuale di positività lasciano supporre che le cellule insulari non possano essere solo quelle residue dalla distruzione dell'organo, ma che possano anche attraversare un processo di rigenerazione. Questo testimonia che il tessuto endocrino è andato incontro inizialmente ad un processo di dissociazione e di disorganizzazione, manifestatosi in alcuni animali anche con sintomi clinici, ma che poi sia stato in grado di riorganizzarsi fino ad un livello paragonabile a quello del gruppo di controllo. Il fatto trova riscontro nei livelli di glicemia normali misurati alla terza settimana. L'analisi statistica dei dati morfometrici delle positività endocrine in relazione al tipo di diagnosi morfologica ha evidenziato in particolare una differenza tra il gruppo delle pancreatiti acute e il tessuto pancreatico normale.

L'aspetto istologico può ricordare, pur con diversi tempi di transizione, fenomeni simili descritti in letteratura. Spesso, infatti, a seguito di un grave danno pancreatico sono stati descritti quadri morfologici con frammentazione delle isole in cluster di cellule endocrine più piccoli, talvolta accompagnati da un concomitante squilibrio metabolico. Le descrizioni spesso hanno incluso due tipi di cambiamenti: prima la degenerazione e poi la rigenerazione. Ad esempio, Catala e colleghi hanno descritto istologicamente i pancreas di conigli resi diabetici in seguito a pancreatite indotta dalla legatura del dotto pancreatico, così come Wang e collaboratori nel ratto. All'insorgenza dell'iperglicemia, trenta giorni dopo l'operazione, dopo colorazione H&E le isole visibili erano assenti e le cellule ductulari erano in proliferazione, mentre le IHC mostravano solo positività deboli in cellule disseminate o in piccoli gruppi; seguiva poi la formazione di ampi gruppi di cellule endocrine solo al novantesimo giorno (Catala et al., 1987; Catala et al., 1990; Wang et al., 1995).

All'interno del gruppo di tacchini da noi analizzati, pochi animali hanno sviluppato un'iperglicemia transitoria. È difficile definire se questo dismetabolismo possa essere una forma di "diabete" temporaneo, poiché la patogenesi di questa malattia non è ancora stata del tutto compresa negli uccelli. I volatili hanno un tasso glicemico normalmente già alto rispetto ai mammiferi (Pilny, 2008) e la loro condizione fisiologica – con una combinazione di livelli alti di glicemia, livelli di insulina e di glucagone alti e insulino-resistenza – presenta di per sé dei punti in comune con il diabete nell'uomo (Datar e Bhonde, 2011). L'importanza rivestita dall'insulina nel metabolismo dei volatili è ancora dibattuta poiché essa non risponde al glucosio come stimolo principale (King e Hazelwood, 1976) e perché sembra che nella glicoregolazione degli uccelli granivori il glucagone sia più efficiente (Rae, 1995), portando alla convinzione diffusa (ma non ancora accertata) che negli uccelli l'iperglicemia nel diabete sia causata dall'iperproduzione di glucagone e non dal deficit di insulina come accade nei mammiferi (Datar e Bhonde, 2011). Inoltre l'insulina prevale di solito negli animali in uno stato di buona nutrizione e il glucagone nel digiuno (Hazelwood, 2000). Di conseguenza, poiché durante la sperimentazione i tacchini erano stati alimentati *ad libitum*, era probabile che un danno alla componente endocrina del pancreas si manifestasse come iperglicemia (Capua et al., 2013). I nostri risultati, comunque, hanno mostrato che il pancreas endocrino subisce dal punto di vista morfologico delle ripercussioni sia sulle cellule che secernono glucagone sia sulle cellule che secernono insulina.

L'associazione tra la presenza di una pancreatite ad eziologia virale sostenuta dal virus influenzale e lo sviluppo dell'iperglicemia ha proposto il tacchino e l'influenza aviaria come modello di eziopatogenesi virale di diabete (Capua et al., 2013). Il diabete mellito di tipo 1 nell'uomo sta assumendo negli ultimi decenni proporzioni epidemiche con aumento annuo dell'incidenza del 3-4% in Europa (EURODIAB ACE Study group, 2000). Una riconosciuta base genetica non sembra sufficiente a giustificare un tale aumento ed è maturata nella comunità scientifica l'ipotesi che esista un contributo scatenante fornito da fattori eziologici di natura ambientale. Parte della comunità scientifica si è concentrata sul possibile ruolo delle infezioni, soprattutto virali, nell'eziopatogenesi di questa patologia (Goldberg e Krause, 2009). Le correlazioni tra infezioni virali e insorgenza di diabete sono state indagate nell'uomo e nei modelli da laboratorio. Si sono registrate correlazioni nel caso soprattutto di Enterovirus, in particolare i Coxsackievirus (Richardson et al., 2009; Willcox et al., 2011), ma anche di Cytomegalovirus (Pak et al., 1988), Rotavirus (Graham et al., 2008), virus della rosolia e della parotite epidemica (Coppieters et al., 2012), virus influenzali di tipo B (Sano et al., 2008) e virus dell'encefalomiocardite (Craighead e McLane, 1968). Sono diversi i meccanismi proposti

attraverso i quali le infezioni virali potrebbero causare un attacco autoimmune delle cellule endocrine pancreatiche. Si è ipotizzato che le infezioni virali possano avere come target di replicazione specifico il pancreas endocrino con un effetto citolitico diretto (Coppieters et al., 2012). Un'altra ipotesi è che esistano omologie strutturali tra le sequenze amminoacidiche degli antigeni virali che vengono riconosciute dal sistema immunitario e gli antigeni self delle cellule insulari, in un fenomeno di *molecular mimicry* (Kaufman et al., 92; Hiemstra et al., 2001). Si è pensato che il processo infiammatorio del pancreas iniziato dall'infezione virale possa provocare un'aspecifica *attivazione bystander* dei linfociti T sensibilizzandoli ad antigeni insulari (Horwitz et al., 1998) o, ancora, che le cellule β siano distrutte non tanto dai linfociti T quanto dal danno infiammatorio subito per le molecole solubili rilasciate dagli effettori antivirali come le citochine (Coppieters et al., 2012). Le evidenze a favore del ruolo eziologico dei virus nel diabete, tuttavia, si scontrano anche con quelli che, al contrario, ne provano il ruolo protettivo (Borchers et al., 2010). L'associazione proposta è estremamente complessa e ancora da indagare.

La maggior parte dei dati ottenuti fino ad oggi sono basati principalmente su evidenze di tipo epidemiologico. Solo recentemente gli studi sono stati fatti in maniera più approfondita, ricercando il genoma dei virus indagati nei campioni di pancreas tramite l'ausilio di tecniche di biologia molecolare o utilizzando l'immunoistochimica. L'immunoistochimica è stata la tecnica principalmente adottata anche in questo lavoro, utilizzata per verificare la presenza del virus influenzale in relazione alla parte esocrina e endocrina del pancreas, in vista di un possibile ruolo eziologico nella patogenesi del diabete. Il diabete mellito di tipo 1 è una patologia autoimmune caratterizzata morfologicamente dall'infiltrato linfocitico delle isole con distruzione delle cellule β ("insulite") prima dello sviluppo clinico della patologia. L'insulite indotta da virus è spesso lieve e transitoria rispetto all'infiammazione osservata nel diabete spontaneo e comporta spesso danno endoteliale (Seemayer et al., 1982). Nelle sezioni di pancreas da noi descritte non si è osservata la presenza di infiltrato infiammatorio nelle isole di Langerhans né degenerazione delle cellule endocrine, pertanto dal punto di vista istologico questa situazione non appare come una condizione diabetica in senso classico. Inoltre le colorazioni immunoistochimiche hanno indotto a pensare che il pancreas endocrino non costituisca un target di replicazione specifica del virus influenzale. Lo squilibrio della glicemia registrato nei tacchini clinicamente paragonabile ad una condizione diabetica non sembrerebbe, dunque, derivare da un danno citolitico diretto derivante dall'ipotetica replicazione del virus influenzale all'interno delle isole di Langerhans. Tuttavia è comunque presente un danno del comparto endocrino a seguito dell'infiammazione e della necrosi del parenchima esocrino,

testimoniato in maniera oggettiva dai rilievi morfologici e morfometrici sulle isole insulina e glucagone-positive che hanno descritto una dissociazione delle stesse in elementi più piccoli. In generale tutte le patologie del pancreas di tipo infiammatorio acuto hanno il potenziale di causare alterazioni della funzionalità sia esocrina che endocrina, con possibile sviluppo di sintomi di diabete mellito, sia negli animali domestici e da laboratorio che nell'uomo (Garip et al., 2013).

Nel campo aviario le segnalazioni sono sporadiche e limitate alle specie da compagnia: è stato riportato il caso di una calopsite che aveva una pancreatite da Herpesvirus e presentava sintomi di diabete mellito (Phalen et al., 2007). Maggiori sono gli esempi forniti dai modelli animali di pancreatite indotta meccanicamente, ad esempio con legatura del dotto pancreatico. A seguito del danno riportato dal pancreas esocrino – con disorganizzazione e sostituzione con tessuto fibroso – si osserva anche iperglicemia e dissociazione delle isole con frammentazione e dispersione delle cellule endocrine (Ambromovage et al., 1973; Catala et al., 1987). Tali anomalie a carico delle isole potrebbero spiegare eventuali disturbi della glicemia. Alcuni autori suggeriscono che i cambiamenti del parenchima esocrino coinvolgano le isole a causa della reazione infiammatoria che potrebbe causare un'alterazione della risposta fisiologica agli stimoli tramite la distruzione delle fibre nervose e dei vasi sanguigni con conseguente anossia insulare (Catala et al., 1987) o a causa della deposizione massiva di tessuto fibroso provocante anossia (Ambromovage et al., 1973). L'ipossia è considerata uno dei principali meccanismi di danno alle isole pancreatiche (Haligur et al., 2012). I pancreas dei tacchini descritti hanno esibito un simile aspetto morfologico. L'insorgenza delle lesioni è stata rapida così come le alterazioni delle funzionalità. Si può ragionevolmente concludere che anche nel nostro caso gli imponenti meccanismi istolesivi messi in moto dall'infezione virale, sebbene vadano a colpire in maniera diretta solo il pancreas esocrino, abbiano provocato delle ripercussioni anche sulla componente endocrina. Questo può aver portato, in un numero limitato di soggetti, un aumento transitorio della glicemia.

La transizione tra gli stadi di lesione osservati nei pancreas dei tacchini è stata rapida. In un periodo di tempo limitato tra i 7 e i 10 dpi sono emersi infatti interessanti caratteri di rigenerazione tissutale. Il fenomeno più rilevante è stato l'iperplasia dei dotti di piccolo calibro, che in alcuni campioni erano talmente diffusi da rivestire la maggior parte della superficie della sezione. È da notare che negli stessi vetrini si è registrata anche la presenza di mitosi. Inoltre, alle colorazioni IHC per insulina e glucagone si sono osservati piccoli gruppi di cellule positive nelle immediate vicinanze di questi dotti e, in qualche caso, ci sono state positività anche all'interno delle cellule epiteliali dei duttoli stessi. Questi dati nel loro insieme suggeriscono che

nell'organo si stiano verificando processi di riparazione e di rigenerazione tissutale che coinvolgono sia il pancreas esocrino che quello endocrino. Ciò può essere avvalorato dal fatto che nelle fasi successive si è osservato come il parenchima esocrino distrutto e disorganizzato è stato sostituito da un'estesa fibrosi e che in alcuni pancreas a 39 dpi si sono misurate isole endocrine di dimensioni massime ragguardevoli.

Nei modelli animali di pancreatite e di diabete, allo stesso modo, spesso si osservano metaplasia acino-duttale con formazione di complessi duttali in forte attività proliferativa e aumento del numero di cellule endocrine presenti (Wang et al., 1995; Bouwens, 1998). Le prove di rigenerazione negli animali adulti derivano soprattutto da studi morfologici accumulati da un danno all'intero pancreas con infiammazione e riparazione (Xia et al., 2009). Alcuni giorni dopo il danno si osservano soprattutto cellule endocrine singole o in piccoli gruppi, non si conosce se come residui di vecchie isole dissociate o come cellule nuove (Catala et al., 1987). Successivamente spesso si descrive una disorganizzazione del parenchima esocrino con iperplasia dei dotti e iperplasia delle cellule insulari (Wang et al., 1995). I pancreas dei tacchini tra 7 e 10 dpi hanno un aspetto morfologico simile a quanto descritto durante alcuni di questi studi. Ad esempio anche in letteratura è stata descritta la possibile presenza di cellule endocrine nell'epitelio dei dotti: dopo distruzione delle cellule β con streptozotocina in ratti neonati si sono osservate positività all'IHC per l'insulina nell'epitelio dei dotti così come gruppi di cellule positive vicino ad essi (Cantenys et al., 1981) unitamente ad un aumento delle mitosi nei dotti (Dutrillaux et al., 1982). Inoltre, Wang e colleghi hanno descritto in ratti adulti il processo di rigenerazione a seguito di legatura del dotto pancreatico con lo sviluppo di isole e di complessi duttali nel tessuto connettivo pancreatico osservando positività per insulina nell'epitelio duttale. Tramite IHC doppia per la citocheratina 20 (CK 20, usata come marker dell'epitelio duttale) e per l'insulina, così come tramite il rilievo dell'espressione del trasportatore GLUT-2, hanno mostrato la possibilità di una citodifferenziazione delle cellule duttali in cellule α o β . Con il marcatore di proliferazione cellulare BrdU hanno indicato che esiste un'attiva proliferazione delle cellule duttali e delle cellule β , ipotizzando quindi la proliferazione e la metaplasia delle cellule duttali in cellule endocrine (Wang et al., 1995). Li e collaboratori hanno anche mostrato che le cellule duttali adulte in risposta ad un insulto possono de-differenziarsi fino ad esprimere marcatori tipici dell'epitelio pancreatico embrionale così come di neurogenina 3, fattore di trascrizione specifico delle cellule endocrine (Li et al., 2010).

Sono state formulate diverse ipotesi riguardo i meccanismi di riparazione e rigenerazione delle cellule β . Alcuni autori sostengono che siano le cellule β pre-esistenti la maggior fonte di nuove cellule β durante la vita adulta, così come durante la rigenerazione (Dor et al., 2004), altri

invece ipotizzano che esistano cellule staminali pancreatiche (Bonner-Weir e Sharma, 2002). Altri autori hanno dimostrato che le cellule endocrine possono originare dall'epitelio dei dotti pancreatici, osservandone la proliferazione e differenziazione (Wang et al., 1995). Inoltre è stato ipotizzato che le cellule degli acini o le cellule endocrine diverse dalle β possano transdifferenziare in cellule duttali (Houbracken et al., 2011) o in quelle secernenti insulina (Zhou et al., 2008). Per contro alcuni autori sostengono che la neogenesi di cellule β non possa avvenire nei pancreas adulti (Xiao et al., 2013) ed escludono che le cellule duttali possano differenziarsi in cellule endocrine (Jacob, 1977). In tal caso la plasticità del pancreas sarebbe solo apparente, derivando dalla capacità delle cellule acinose di cambiare differenziazione e delle cellule endocrine esistenti di riorganizzarsi vicino ai dotti (Blaine et al., 2010). Capire se possa esistere la neogenesi insulare, da quali precursori e per quali meccanismi regolatori è attualmente un'interessante frontiera di ricerca nell'ottica del potenziale terapeutico per il diabete.

6. CONCLUSIONI

Questo studio conferma che infezioni con virus influenzali aviari a bassa patogenicità (LPAI) possono portare nei tacchini, accanto ad una lieve sintomatologia influenzale (es. sintomi respiratori ed enterici), anche danni pancreatici, in accordo con quanto osservato durante alcune epidemie di campo italiane.

Si è mostrato come durante la fase acuta dell'infezione virale il virus possa replicare nelle cellule degli acini esocrini del pancreas, causando un grave danno di tipo necrotico e infiammatorio, responsabili probabilmente dell'aumento delle concentrazioni ematiche di enzimi pancreatici. Al contrario, dal nostro studio non si può affermare che il pancreas endocrino sia un target specifico di replicazione virale, sebbene in ogni caso potrebbe comunque verificarsi un danno ricollegabile all'infezione con il virus LPAI: infatti, l'osservazione di un processo di distruzione delle isole endocrine, sia glucagone-secernenti sia insulina-secernenti, in alcuni animali clinicamente associato ad iperglicemia transitoria. Questo studio, pertanto, suggerisce che il virus influenzale nel tacchino possa essere causa di pancreatite e che questo fatto possa riflettersi in disturbi dell'omeostasi del glucosio legati alla patologia, un meccanismo descritto in altri animali e nell'uomo.

Si sono evidenziati inoltre processi rigenerativi nel pancreas esocrino in seguito alla fase acuta di infezione, come si nota in particolare dalla proliferazione duttulare associata a evidenza di figure mitosi mitotiche in eventuali porzioni esocrine residue. In aggiunta, anche la porzione endocrina sembra in grado di rigenerare, come evidenziato da un aumento in fase post-necrotica della quantità di cellule positive agli ormoni e dalla presenza di insulina e glucagone nelle cellule epiteliali duttali. Questi fenomeni rientrano in quelli proposti in letteratura come meccanismi di rigenerazione del tessuto pancreatico e rappresentano un interessante ambito di studio nell'ottica delle possibili implicazioni terapeutiche per il diabete.

Bibliografia

- Acland HM, Silverman Bachin LA e Eckroade RJ (1984). Lesions in broiler and layer chickens in an outbreak of highly pathogenic avian influenza virus infection. *Vet Pathol* 21: 564-569.
- Alexander DJ (2007). An overview of the epidemiology of avian influenza. *Vaccine* 25: 5637-5644.
- Alexander DJ (2008). Orthomyxoviridae - avian influenza. Cap. 26 in *Poultry diseases*, a cura di Pattison M, McMullin PF, Bradbury JM e Alexander DJ: 317-332. Philadelphia: Saunders Elsevier.
- Ambromovage AM, Pairent FW e Howard JM (1973). Pancreatic exocrine insufficiency. V. The effects of long-term pancreatic duct ligation on serum insulin levels and glucose metabolism in the dog. *Ann Surg* 177: 338-343.
- Beato MS, Xu Y, Long LP, Capua I e Wan XF (2014). Antigenic and genetic evolution of low pathogenic avian influenza viruses (H7N3) following heterologous vaccination. *Clin Vaccine Immunol* 21: 603-612
- Beghelli V (1998). Apparato digerente. Cap. 12 in *Fisiologia degli animali domestici con elementi di etologia*, di Aguggini G, Beghelli V e Giulio LF: 539-553. Torino: UTET.
- Blaine SA, Ray KC, Anunobi R, Gannon MA, Washington MK e Means AL (2010). Adult pancreatic acinar cells give rise to ducts but not endocrine cells in response to growth factor signaling. *Development* 137: 2289-2296.
- Bonner-Weir S e Sharma A (2002). Pancreatic stem cells. *J Pathol* 197: 519-526.
- Borchers AT, Uibo R e Gershwin ME (2010). The geoepidemiology of type 1 diabetes. *Autoimmun Rev* 9: 355-365
- Bouwens L (1998). Transdifferentiation versus stem cell hypothesis for the regeneration of islet beta-cells in the pancreas. *Microsc Res Tech* 43: 332-336.
- Braun EJ e Sweazea KL (2008). Glucose regulation in birds. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 151: 1-9.
- Bröjer C, Agren EO, Uhlhorn H, Bernodt K, Mörner T, Jansson DS, Mattson R, Zohari S, Thorén P, Berg M e Gavier-Widén D (2009). Pathology of natural highly pathogenic avian

influenza H5N1 infection in wild tufted ducks (*Aythya fuligula*). *J Vet Diagn Invest* 21: 579-587.

Brzęk P, Ciminari ME, Kohl KD, Lessner K, Karasov WH e Caviedes-Vidal E (2013). Effect of age and diet composition on activity of pancreatic enzymes in birds. *J Comp Physiol B* 183: 685-697.

Candeletta SC, Homer BL, Garner MM e Isaza R (1993). Diabetes mellitus associated with chronic lymphocytic pancreatitis in an African grey parrot (*Psittacus erithacus erithacus*). *J Assoc Avian Vet* 7: 39-43.

Cantenys D, Portha B, Dutrillaux MC, Hollande E, Rozé C e Picon L (1981). Histogenesis of the endocrine pancreas in newborn rats after destruction by streptozotocin. An immunocytochemical study. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 35: 109-122.

Capua I e Marangon S (2000). The avian influenza epidemic in Italy, 1999-2000: a review. *Avian Pathol* 29: 289-294.

Capua I, Mutinelli F, Marangon S e Alexander DJ (2000). H7N1 avian influenza in Italy (1999 to 2000) in intensively reared chickens and turkeys. *Avian Pathol* 29: 537-543.

Capua I, Mercalli A, Pizzuto MS, Romero-Tejeda A, Kasloff S, De Battisti C, Bonfante F, Patrono LV, Vicenzi E, Zappulli V, Lampasona V, Stefani A, Doglioni C, Terregino C, Cattoli G e Piemonti L (2013). Influenza A viruses grow in human pancreatic cells and cause pancreatitis and diabetes in an animal model. *J Virol* 87: 597-610.

Catala J, Bonnafous R, Dutrillaux MC e Hollande E (1987). Dissociation of Langerhans islets in the rabbit after pancreatic duct ligation. Immunocytochemical and ultrastructural studies. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 52: 539-551.

Catala J, Hadjiisky P, Bonnafous R e Fichaux F (1990). Cell features in pancreas of prediabetic and diabetic rabbits after Wirsung duct ligation. Histochemical and histoenzymatic studies. *Acta Diabetol Lat* 27: 59-69.

Cattoli G, Terregino C, Bertoli E, Ortali G, Marangon S e Capua I (2003). The H7N3 avian influenza outbreak in Northern Italy in 2002. *Proceedings of the 52nd Western Poultry disease conference*: 23-25.

Clara, M (1924). Das pankreas der vögel. *Anat Anz* 57: 257-265.

- Colca JR e Hazelwood RL (1981). Insulin, pancreatic polypeptide, and glucagon release from the chicken pancreas in vitro: responses to changes in medium glucose and free fatty acid content. *Gen Comp Endocrinol* 45: 482-490.
- Coppieters KT, Boettler T e von Herrath M (2012). Virus infections in type 1 diabetes. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2: a007682.
- Craighead JE e McLane MF (1968). Diabetes mellitus: induction in mice by encephalomyocarditis virus. *Science* 162: 913-914.
- Datar SP e Bhonde RR (2011). Modeling chick to assess diabetes pathogenesis and treatment. *Rev Diabet Stud* 8: 245-253.
- De Cock HE, Forman MA, Farver TB e Marks SL (2007). Prevalence and histopathologic characteristics of pancreatitis in cats. *Vet Pathol* 44: 39-49.
- Dellmann HD e Eurell JA (2000). *Istologia e anatomia microscopica veterinaria*, a cura di Bortolami R e Lucchi ML: 269-270, 405-407. Milano: Casa editrice ambrosiana.
- Denbow DM (2000). Gastrointestinal anatomy and physiology. Cap. 12 in *Sturkie's avian physiology*, di Sturkie PD, a cura di Whittow CG: 299-325. San Diego: Academic Press.
- Desmarchelier M e Langlois I (2008). Diabetes mellitus in a nanday conure (*Nandayus nenday*). *J Avian Med Surg* 22: 246-254.
- Direttiva 2005/94/CE del consiglio del 20 dicembre 2005 relativa a misure comunitarie contro l'influenza aviaria e che abroga la direttiva 92/40/CEE (2006). EurLex, in eur-lex.europa.eu (consultato il giorno 03.05.2014)
- Di Trani L, Bedini B, Cordioli P, Muscillo M, Vignolo E, Moreno A e Tollis M (2004). Molecular characterization of low pathogenicity H7N3 avian influenza viruses isolated in Italy. *Avian Dis* 48: 376-383.
- Dockray GJ (1973). Vasoactive intestinal peptide: secretin-like action on the avian pancreas. *Experientia* 29: 1510-1511.
- Doneley RJ (2001). Acute pancreatitis in parrots. *Aust Vet J* 79: 409-411.
- Dor Y, Brown J, Martinez OI e Melton DA (2004). Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* 429: 41-46.
- Douglass EM (1981). Diabetes mellitus in a toco toucan. *Mod Vet Pract* 62: 293-295.

- Dutrillaux MC, Portha B, Rozé C e Hollande E (1982). Ultrastructural study of pancreatic B cell regeneration in newborn rats after destruction by streptozotocin. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 39: 173-185.
- Dyce KM, Sack WO e Wensing CJG (2008). *Testo di anatomia veterinaria*, traduzione di Mascarello F, Ceccarelli P e Germanà G: 138-139, 216. Roma: Antonio Delfino editore.
- EURODIAB ACE Study Group (2000). Variation and trends in incidence of childhood diabetes in Europe. EURODIAB ACE Study Group. *Lancet* 355: 873-876.
- Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D, Rimmelzwaan GF, Olsten B e Osterhaus AD (2005). Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol* 79: 2814-2822.
- Gancz AY, Wellehan JF, Boutette J, Malka S, Lee SE, Smith DA e Taylor M (2007). Diabetes mellitus concurrent with hepatic haemosiderosis in two macaws (*Ara severa*, *Ara militaris*). *Avian Pathol* 36: 331-336.
- Garip G, Sarandöl E e Kaya E (2013). Effects of disease severity and necrosis on pancreatic dysfunction after acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 19: 8065-8070.
- Goldberg E e Krause I (2009). Infection and type 1 diabetes mellitus - a two edged sword? *Autoimmun Rev* 8: 682-686.
- Graham KL, Sanders N, Tan Y, Allison J, Kay TW e Coulson BS (2008). Rotavirus infection accelerates type 1 diabetes in mice with established insulinitis. *J Virol* 82: 6139-6149.
- Gross R e Mialhe P (1986). Free fatty acids and pancreatic function in the duck. *Acta Endocrinol (Copenh)* 112: 100-104.
- Gülmez N (2003). Are glands present in goose pancreatic ducts? A light microscope study. *JOP* 4: 125-128.
- Gülmez N, Kocamiş H, Aslan Ş e Nazli M (2004). Immunohistochemical distribution of cells containing insulin, glucagon and somatostatin in the goose (*Anser anser*) pancreas. *Turk J Vet Anim Sci* 28: 403-407.
- Haligur M, Topsakal S e Ozmen O (2012). Early degenerative effects of diabetes mellitus on pancreas, liver, and kidney in rats: an immunohistochemical study. *Exp Diabetes Res* 2012: 120645.

- Hazelwood RL e Langslow DR (1978). Intrapancreatic regulation of hormone secretion in the domestic fowl, *Gallus domesticus*. *J Endocrinol* 76: 449-459.
- Hazelwood RL (1984). Pancreatic hormones, insulin/glucagon molar ratios, and somatostatin as determinants of avian carbohydrate metabolism. *J Exp Zool* 232: 647-652.
- Hazelwood RL (2000). Pancreas. Cap. 20 in *Sturkie's avian physiology*, di Sturkie PD, a cura di Whittow CG: 539-555. San Diego: Academic Press.
- Hellerström C (1963). Enzyme histochemistry of the pancreatic islets in the duck with special reference to the two types of A cells. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 60: 688-710.
- Hellman B e Hellerström C (1960). The islets of Langerhans in ducks and chickens with special reference to the argyrophil reaction. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 52: 278-290.
- Hiemstra HS, Schloot NC, van Veelen PA, Willemsen SJ, Franken KL, van Rood JJ, de Vries RR, Chaudhuri A, Behan PO, Drijfhout JW e Roep BO (2001). Cytomegalovirus in autoimmunity: T cell crossreactivity to viral antigen and autoantigen glutamic acid decarboxylase. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 3988-3991.
- Hong J, Abudula R, Chen J, Jeppesen PB, Dyrskog SE, Xiao J, Colombo M, Hermansen K (2005). The short-term effect of fatty acids on glucagon secretion is influenced by their chain length, spatial configuration, and degree of unsaturation: studies in vitro. *Metabolism* 54: 1329-1336.
- Horwitz MS, Bradley LM, Harbertson J, Krahl T, Lee J e Sarvetnick N (1998). Diabetes induced by Coxsackie virus: initiation by bystander damage and not molecular mimicry. *Nat Med* 4: 781-785.
- Houbracken I, de Waele E, Lardon J, Ling Z, Heimberg H, Rooman I e Bouwens L (2011). Lineage tracing evidence for transdifferentiation of acinar to duct cells and plasticity of human pancreas. *Gastroenterology* 141: 731-741.
- Hulan HW e Bird FH (1972). Effect of fat level in isonitrogenous diets on the composition of avian pancreatic juice. *J Nutr* 102: 459-468.
- Iaglov VV (1977). Morphology of the endocrine part of the pancreas of birds. *Arkh Anat Gistol Embriol* 72: 24-27.
- Jacob S (1977). Regeneration of the islets of Langerhans in the Guinea pig. *Cell Tissue Res* 181: 277-286.

- Jung A, Grund C, Müller I e Rautenschlein S (2009). Avian paramyxovirus serotype 3 infection in *Neopsephotus*, *Cyanoramphus*, and *Neophema* species. *J Avian Med Surg* 23: 205-208.
- Karmann H e Mialhe P (1976). Glucose, insulin and glucagon in the diabetic goose. *Horm Metab Res* 8: 419-426.
- Kaufman DL, Erlander MG, Clare-Salzler M, Atkinson MA, Maclaren NK e Tobin AJ (1992). Autoimmunity to two forms of glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 89: 283-292.
- King DL e Hazelwood RL (1976). Regulation of avian insulin secretion by isolated perfused chicken pancreas. *Am J Physiol* 231: 1830-1839.
- Kokue E e Hayama T (1972). Effects of starvation and feeding on the exocrine pancreas of the chicken. *Poult Sci* 51: 1366-1370.
- La Perle KMD e Capen CC (2006). Endocrine system. In *Pathologic basis of veterinary disease*, di McGavin MD e Zachary JF: 734-739. St Louis: Mosby Elsevier.
- Laurent F e Mialhe P (1978). Effect of free fatty acids and amino acids on glucagon and insulin secretions in normal and diabetic ducks. *Diabetologia* 15: 313-321.
- Lee CW e Saif YM (2009). Avian influenza virus. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 32: 301-310.
- Lenz SD, Hoerr FJ, Ellis AC, Toivio-Kinnucan MA e Yu M (1998). Gastrointestinal pathogenicity of adenoviruses and reoviruses isolated from broiler chickens in Alabama. *J Vet Diagn Invest* 10: 145-151.
- Li WC, Rukstalis JM, Nishimura W, Tchipashvili V, Habener JF, Sharma A e Bonner-Weir S (2010). Activation of pancreatic-duct-derived progenitor cells during pancreas regeneration in adult rats. *J Cell Sci* 123: 2792-2802.
- Manáková E e Titlbach M (2007). Development of the chick pancreas with regard to estimation of the relative occurrence and growth of endocrine tissue. *Anat Histol Embryol* 36: 127-134.
- Marangon S (2003). Influenza aviaria in Italia: 1999 – 2003. EpiCentro, www.epicentro.iss.it/focus/flu_aviaria/AIReport.pdf (consultato il giorno 03.05.2014).
- Mikami SI e Ono K (1962). Glucagon deficiency induced by extirpation of alpha islets of the fowl pancreas. *Endocrinology* 71: 464-473.

- Mikami SI e Mutoh K (1971). Light- and electron-microscopic studies of the pancreatic islet cells in the chicken under normal and experimental conditions. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 116: 205-227.
- Mirandé LA, Howerth EW e Poston RP (1992). Chlamydiosis in a red-tailed hawk (*Buteo jamaicensis*). *J Wildl Dis* 28: 284-287.
- Mobini B e Aghaabedi B (2009). Histological and histochemical studies on pancreas of native turkey in Iran. *Vet J Pajouhesh & Sazandegi* 22: 2-8.
- Mobini B (2011). Histological studies on pancreas of goose (*Anser albifrons*).» *VRF* 2: 25-29.
- Naber SP e Hazelwood RL (1977). In vitro insulin release from chicken pancreas. *Gen Comp Endocrinol* 32: 495-504.
- Nakamura K, Ohtsu N, Nakamura T, Yamamoto Y, Yamada M, Mase M e Imai K (2008). Pathologic and immunohistochemical studies of Newcastle disease (ND) in broiler chickens vaccinated with ND: severe nonpurulent encephalitis and necrotizing pancreatitis. *Vet Pathol* 45: 928-933.
- Nili H, McNally A, Aldous E, Nunez A, Banks J e Brown IH (2008). Pathological changes in turkeys experimentally infected with different doses of A/ostrich/Italy/984/2000 H7N1 avian influenza virus. *Iran J Vet Res* 9: 330-335.
- Ogawa S, Yamamoto Y, Yamada M, Mase M e Nakamura K (2009). Pathology of whooper swans (*Cygnus cygnus*) infected with H5N1 avian influenza virus in Akita, Japan, in 2008. *J Vet Med Sci* 71: 1377-1380.
- OIE - World organization for animal health (2013). Infection with avian influenza viruses. *Terrestrial animal health code*. Parigi.
- Okamatsu M, Saito T, Yamamoto Y, Mase M, Tsuduku S, Nakamura K, Tsukamoto K e Yamaguchi S (2007). Low pathogenicity H5N2 avian influenza outbreak in Japan during the 2005-2006. *Vet Microbiol* 124: 35-46.
- Olsen B, Munster VJ, Wallensten A, Waldenström J, Osterhaus AD e Fouchier RA (2006). Global patterns of influenza A virus in wild birds. *Science* 312: 384-388.
- Oughton M, Dascal A, Laporta D, Charest H, Afilalo M e Miller M (2011). Evidence of viremia in 2 cases of severe pandemic influenza A H1N1/09. *Diagn Microbiol Infect Dis* 70: 213-217.

- Pak CY, Eun HM, McArthur RG e Yoon JW (1988). Association of cytomegalovirus infection with autoimmune type 1 diabetes. *Lancet* 2: 1-4.
- Palmieri C, Franca M, Uzal F, Anderson M, Barr B, Woods L, Moore J, Woolcock P e Shivaprasad HL (2011). Pathology and immunohistochemical findings of west nile virus infection in psittaciformes. *Vet Pathol* 48: 975-984.
- Perdue ML, Latimer JW e Crawford JM (1995). A novel carbohydrate addition site on the hemagglutinin protein of a highly pathogenic H7 subtype avian influenza virus. *Virology* 213: 276-281.
- Perdue ML e Swayne DE (2005). Public health risk from avian influenza viruses. *Avian Dis* 49: 317-327.
- Perdue ML (2008). Molecular determinants of pathogenicity for avian influenza viruses. Cap. 2 in *Avian influenza*, a cura di Swayne DE: 23-42. Oxford: Blackwell Publishing.
- Perkins LE e Swayne DE (2001). Pathobiology of A/chicken/Hong Kong/220/97 (H5N1) avian influenza virus in seven gallinaceous species. *Vet Pathol* 38: 149-64.
- Phalen DN, Falcon M e Tomaszewski EK (2007). Endocrine pancreatic insufficiency secondary to chronic herpesvirus pancreatitis in a cockatiel (*Nymphicus hollandicus*). *J Avian Med Surg* 21: 140-145.
- Pilny AA e Luong R (2005). Diabetes mellitus in a chestnut-fronted macaw (*Ara severa*). *J Avian Med Surg* 19: 297-302.
- Pilny AA (2008). The avian pancreas in health and disease. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract* 11: 25-34.
- Pollock C (2002). Carbohydrate regulation in avian species. *Semin Avian Exotic Pet Med* 11: 57-64.
- Pubols MH (1991). Ratio of digestive enzymes in the chick pancreas. *Poult Sci* 70: 337-342.
- Qian DH, Zhu GJ, Wu LZ e Hua GX (2006). Isolation and characterization of a coronavirus from pigeons with pancreatitis. *Am J Vet Res* 67: 1575-1579.
- Rae M (1995). Endocrine disease in pet birds. *Semin Avian Exotic Pet Med* 4: 32-38.
- Ramos-Vara JA, Kiupel M, Baszler T, Bliven L, Brodersen B, Chelack B, Czub S, Del Piero F, Dial S, Ehrhart EJ, Graham T, Manning L, Paulsen D, Valli VE, West K e American association of veterinary laboratory diagnosticians subcommittee on standardization of

immunoistochemistry (2008). Suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories. *J Vet Diagn Invest* 20: 393-413..

Rawdon BB e Andrew A (1979). An immunocytochemical study of the distribution of pancreatic endocrine cells in chicks, with special reference to the relationship between pancreatic polypeptide and somatostatin-immunoreactive cells. *Histochemistry* 59: 189-197.

Richardson SJ, Willcox A, Bone AJ, Foulis AK e Morgan NG (2009). The prevalence of enteroviral capsid protein vp1 immunostaining in pancreatic islets in human type 1 diabetes. *Diabetologia* 52: 1143-1151.

Rideau N (1998). Peculiarities of insulin secretion in chickens. *Ann N Y Acad Sci* 839: 162-165.

Ruffier L, Simon J e Rideau N (1998). Isolation of functional glucagon islets of Langerhans from the chicken pancreas. *Gen Comp Endocrinol* 112: 153-162.

Sano H, Terasaki J, Tsutsumi C, Imagawa A e Hanafusa T (2008). A case of fulminant type 1 diabetes mellitus after influenza B infection. *Diabetes Res Clin Pract* 79: 8-9.

Satoh S, Furuse M e Okumura J (1995). Factors influencing the intestinal phase of pancreatic exocrine secretion in the turkey. *Experientia* 51: 249-251.

Schmidt RE e Reavill DR (2014). Lesions of the avian pancreas. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract* 17: 1-11.

Seemayer TA, Tannenbaum GS, Goldman H e Colle E (1982). Dynamic time course studies of the spontaneously diabetic BB Wistar rat. III. Light-microscopic and ultrastructural observations of pancreatic islets of Langerhans. *Am J Pathol* 106: 237-249.

Shinya K, Awakura T, Shimada A, Silvano FD, Umemura T e Otsuki K (1995). Pathogenesis of pancreatic atrophy by avian influenza a virus infection. *Avian Pathol* 24: 623-632.

Spackman E, Gelb J Jr, Preskenis LA, Ladman BS, Pope CR, Pantin-Jackwood MJ e McKinley ET (2010). The pathogenesis of low pathogenicity H7 avian influenza viruses in chickens, ducks and turkeys. *Virology* 7: 331.

Stallknecht DE e Brown JD (2008). Ecology of avian influenza in wild birds. Cap. 3 in *Avian influenza*, a cura di Swayne DE: 43-56. Oxford: Blackwell Publishing.

Swayne DE (2008a). Influenza A virus. Cap. 1 in *Avian influenza*, a cura di Swayne DE: 3-22. Oxford: Blackwell Publishing.

Swayne DE (2008b). Epidemiology of avian influenza in agricultural and other man-made systems. Cap. 4 in *Avian influenza*, a cura di Swayne DE: 59-86. Oxford: Blackwell Publishing.

Swayne DE e Pantin-Jackwood M (2008). Pathobiology of avian influenza virus infections in birds and mammals. Cap. 5 in *Avian influenza*, a cura di Swayne DE: 87-122. Oxford: Blackwell Publishing.

Teifke JP, Klopfleisch R, Globig A, Starick E, Hoffmann B, Wolf PU, Beer M, Mettenleiter TC e Harder TC (2007). Pathology of natural infections by H5N1 highly pathogenic avian influenza virus in mute (*Cygnus olor*) and whooper (*Cygnus cygnus*) swans. *Vet Pathol* 44: 137-143.

Tse H, To KK, Wen X, Chen H, Chan KH, Tsoi HW, Li IW e Yuen KY (2011). Clinical and virological factors associated with viremia in pandemic influenza A/H1N1/2009 virus infection. *PLoS One* 6: 22534.

van Riel D, van den Brand JM, Munster VJ, Bestebroer TM, Fouchier RA, Osterhaus AD e Kuiken T (2009). Pathology and virus distribution in chickens naturally infected with highly pathogenic avian influenza A virus (H7N7) during the 2003 outbreak in The Netherlands.» *Vet Pathol* 46: 971-976.

Wallner-Pendleton EA, Rogers D e Epple A (1993). Diabetes mellitus in a red-tailed hawk (*Buteo jamaicensis*). *Avian Pathol* 22: 631-635.

Wang RN, Klöppel G e Bouwens L (1995). Duct- to islet-cell differentiation and islet growth in the pancreas of duct-ligated adult rats. *Diabetologia* 38: 1405-1411.

Watson P (2005). Laboratory evaluation of exocrine pancreatic disease. In *BSAVA manual of canine and feline clinical pathology*, a cura di Villiers E e Blackwood L: 226-239.

Weir GC, Goltos PC, Steinberg EP e Patel YC (1976). High concentration of somatostatin immunoreactivity in chicken pancreas. *Diabetologia* 12: 129-132.

WHO - World Health Organization (2014). Influenza at the human-animal interface. WHO, www.who.int/influenza/human_animal_interface/HAI_Risk_Assessment/en (consultato il giorno 04.05.2014).

Willcox A, Richardson SJ, Bone AJ, Foulis AK e Morgan NG (2011). Immunohistochemical analysis of the relationship between islet cell proliferation and the production of the enteroviral capsid protein, VP1, in the islets of patients with recent-onset type 1 diabetes. *Diabetologia* 54: 2417-2420.

- Woo GH, Kim HY, Bae YC, Jean YH, Bak EJ, Kim MJ, Hwang EK e Joo YS (2011). Comparative histopathological characteristics of highly pathogenic avian influenza (HPAI) in chickens and domestic ducks in 2008 Korea. *Histol Histopathol* 26: 167-175.
- Wood GW, McCauley JW, Bashiruddin JB e Alexander DJ (1993). Deduced amino acid sequences at the haemagglutinin cleavage site of avian influenza A viruses of H5 and H7 subtypes. *Arch Virol* 130: 209-217.
- Xia B, Zhan XR, Yi R e Yang B (2009). Can pancreatic duct-derived progenitors be a source of islet regeneration?. *Biochem Biophys Res Commun* 383: 383-385.
- Xiao X, Chen Z, Shiota C, Prasad K, Guo P, El-Gohary Y, Paredes J, Welsh C, Wiersch J e Gittes GK (2013). No evidence for β cell neogenesis in murine adult pancreas. *J Clin Invest* 123: 2207-2217.
- Yadav D e Lowenfels AB (2013). The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer. *Gastroenterology* 144: 1252-1261.
- Zhou Q, Brown J, Kanarek A, Rajagopal J e Melton DA (2008). In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature* 455: 627-632.

Appendice

Tabella A: Esami istopatologici e immunoistochimici dei campioni pancreatici.

Numero progressivo	Sottotipo virale	Dpi	Fase	Esame istopatologico							Esame IHC			Diagnosi morfologica
				infiammazione		Necrosi	Edema	Fibrosi	Iperplasia dutturale	Mitosi	AIV	insulina	glucagone	
				Eterofilica	Linfoplasma-cellulare									
1	H7N1	4	precoce	2/3	0	3	2/3	0	0		+	+	+	pancreatite acuta grave
2	H7N1	4		1	0	0	0	0	0		-	+	+	pancreatite acuta lieve
3	H7N1	4		0	0/1	0	0	0	0		-	+	+	ndr
4	H7N1	4		0	1	0	0	0			-	+	+	ndr
5	H7N3	4		0	0	0	0	0	0		-	+	+	ndr
6	H7N3	4		1	1	0	0	0	0		-	+	+	pancreatite acuta lieve
7	H7N3	4		1	1	1	0	0	0		-	+	+	pancreatite acuta lieve
8	H7N3	4		2	1	2	1/2	2	0		+	+	+	pancreatite subacuta moderata
9	H7N1	7		0	1	0	0	0	0		-	+	+	ndr
10	H7N1	7		0	0	0	0	0	0		-	+	+	ndr
11	H7N1	7		1/2	2/3	1	1	2	3	+	+	+	+	pancreatite subacuta grave
12	H7N1	7		1	0/1	0	0	1	0		-	+	+	pancreatite acuta lieve
13	H7N1	7		2	3	0	2	2	3	+	+	+	+	pancreatite cronica grave
14	H7N1	8	intermedia	1	2/3	0	1	1	3	+	-	+	+	pancreatite cronica moderata
15	H7N3	8		1/2	2/3	0	1	2	3	+	-	+	+	pancreatite cronica grave
16	H7N1	9		2	3	0	0	2	3	+	+	+	+	pancreatite cronica grave
17	H7N1	9		0	0	0	0	0	0		-	+	+	ndr
18	H7N3	9		2	0	3	3	0	0		+	+	-	pancreatite acuta grave
19	H7N1	10		0/1	2/3	0	1/2	1	1	+	-	+	+	pancreatite cronica moderata
20	H7N3	10		2/3	0	2/3	0	3	1		-	+	+	pancreatite subacuta moderata
21	H7N1	17		1	2	0	0	3	1		-	+	+	pancreatite cronica grave
22	H7N3	17		1	2	0	0	1	1		-	+	+	pancreatite cronica moderata
23	H7N3	39	tardiva	1	1	0	0	1	0		-	+	+	pancreatite cronica lieve
24	H7N3	39		0	1	0	0	1	0		-	+	+	pancreatite cronica lieve
25	H7N1	39		0	1	0	0	1	0		-	+	+	pancreatite cronica lieve
26	H7N3	39		1	3	0	0	3	1		-	+	+	pancreatite cronica grave
27	H7N1	39		0	2	0	0	3	0		-	+	+	pancreatite cronica grave
28	H7N1	39		0	1	0	0	1	0		-	+	+	pancreatite cronica lieve
29	controllo	10	ctrl	0	0/1	0	0	0	0		-	+	+	ndr
30	controllo	17		0	0/1	0	0	0	0		-	+	+	ndr

Legenda: dpi = giorni post infezione; ctrl = controlli; 0 = assente, 1 = grado lieve, 2 = grado moderato, 3 = grado grave; + = positività immunoistochimica, - = negatività immunoistochimica; ndr = nulla da rilevare.

Tabella B: Sintesi degli esami molecolare ed ematobiochimico.

Numero progressivo	Dpi	Fase	Esame molecolare				Esame biochimico						
			RRT-PCR (Ct)				Glicemia (mmol/L)				Lipemia (U/L)		
			Trachea (2 dpi)	Trachea (3 dpi)	Viremia (3 dpi)	Pancreas	0 dpi	7 dpi	14 dpi	21 dpi	0 dpi	7 dpi	14 dpi
1	4	precoce	nd	nd	nd	14.69	nd	eut	eut	eut	nd	eut	eut
2	4		nd	nd	nd	33.17	nd	eut	eut	eut	nd	eut	eut
3	4		nd	nd	nd	NEG	nd	eut	eut	eut	nd	eut	eut
4	4		nd	nd	nd	NEG	nd	eut	eut	eut	nd	eut	eut
5	4		nd	nd	nd	NEG	nd	eut	eut	eut	nd	eut	eut
6	4		nd	nd	nd	NEG	nd	eut	eut	eut	nd	eut	eut
7	4		nd	nd	nd	NEG	nd	eut	eut	eut	nd	eut	eut
8	4		nd	nd	nd	17.79	nd	eut	eut	eut	nd	eut	eut
9	7		nd	nd	nd	NEG	nd	17,5	eut	eut	nd	6,3	eut
10	7		nd	nd	nd	35.08	nd	17,6	eut	eut	nd	4,1	eut
11	7		nd	nd	nd	15.25	17,7	nd	eut	eut	5,6	nd	eut
12	7		nd	nd	nd	30.98	nd	15,3	eut	eut	nd	6,9	eut
13	7		nd	nd	nd	nd	nd	13,2	eut	eut	nd	4,4	eut
14	8	intermedia	36.05	29.3	NEG	nd	18,1	17,6	eut	eut	3,7	5,3	eut
15	8		31.77	24.24	35.26	nd	18,4	14,7	eut	eut	4,9	109,9	eut
16	9		nd	nd	nd	17,5	16,8	12,2	eut	eut	14	14,4	eut
17	9		nd	nd	nd	NEG	17,3	17,5	eut	eut	4,8	8,5	eut
18	9		26.04	20.39	32.47	15.23	nd	nd	eut	eut	nd	nd	eut
19	10		nd	nd	nd	20.16	17,6	11,6	eut	eut	10,1	316,8	eut
20	10		nd	nd	nd	21.63	nd	16,2	eut	eut	nd	5,8	eut
21	17		29.55	24.24	NEG	nd	18	14,8	18,9	eut	7,3	87,1	2,2
22	17		NEG	24.01	NEG	nd	20,2	15,6	18,1	eut	7,8	787	2,3
23	39	tardiva	nd	nd	nd	nd	17,7	18,5	16,0	nd	7,9	2,8	2,8
24	39		nd	nd	nd	nd	18,1	14,9	15,5	12,3	6,4	347	8,1
25	39		nd	nd	nd	nd	nd	13,5	33,5	17,7	nd	3	7,4
26	39		nd	nd	nd	nd	17,4	12,1	27,1	16,5	9,4	131,9	2,1
27	39		nd	nd	nd	nd	nd	12,3	14,6	15,9	nd	635,5	35,5
28	39		nd	nd	nd	nd	18	16,6	25,7	18,4	5,6	8,2	9,4
29	10	ctrl	NEG	NEG	NEG	nd	nd	nd	eut	eut	nd	nd	eut
30	17		NEG	NEG	NEG	nd	14,4	16,2	16	eut	3,7	4,9	2,8

Legenda: dpi = giorni post infezione; ctrl = controlli; ndr = nulla da rilevare; nd = non eseguito; NEG = negativo; eut = eutanizzato. I valori in grassetto presentano differenze statisticamente significative.

Tabella C: Valutazione semiquantitativa di pancreatite con lo schema di punteggio di De Cock et al., 2007.

Numero progressivo	Dpi	Fase	Pancreatite acuta		Pancreatite cronica		Totale pancreatite acuta	Totale pancreatite cronica	Diagnosi morfologica
			Infiamm. eterofilica	Necrosi e edema	Infiamm. linfoplasmacellulare	Fibrosi			
1	4	precoce	3	3	0	0	6/6	0/6	Pancreatite acuta grave
2			1	0	0	0	1/6	0/6	Pancreatite acuta lieve
3			0	0	0	0	0/6	0/6	ndr
4			0	0	1	0	0/6	1/6	ndr
5			0	0	0	0	0/6	0/6	ndr
6			1	0	1	0	1/6	1/6	Pancreatite acuta lieve
7			1	1	1	0	2/6	1/6	Pancreatite acuta lieve
8			2	2	1	2	4/6	3/6	Pancreatite subacuta moderata
9			0	0	1	0	0/6	1/6	ndr
10	7		0	0	0	0	0/6	0/6	ndr
11			2	2	3	2	4/6	5/6	Pancreatite subacuta grave
12			1	0	0	1	1/6	1/6	Pancreatite acuta lieve
13			2	0	3	2	2/6	5/6	Pancreatite cronica grave
14	8		1	0	2	1	1/6	3/6	Pancreatite cronica moderata
15			1	1	3	2	2/6	5/6	Pancreatite cronica grave
16	9	intermedia	2	1	3	2	3/6	5/6	Pancreatite cronica grave
17			0	0	0	0	0/6	0/6	ndr
18	10		2	3	2	0	5/6	2/6	Pancreatite acuta grave
19			0	1	3	1	1/6	4/6	Pancreatite cronica moderata
20			2	2	0	3	4/6	3/6	Pancreatite subacuta grave
21	17		1	0	2	3	1/6	5/6	Pancreatite cronica grave
22			1	0	2	1	1/6	3/6	Pancreatite cronica moderata
23	39	tardiva	0	0	1	1	0/6	2/6	Pancreatite cronica lieve
24			0	0	1	1	0/6	2/6	Pancreatite cronica lieve
25			0	0	1	1	0/6	2/6	Pancreatite cronica lieve
26			1	0	3	3	1/6	6/6	Pancreatite cronica grave
27			0	0	2	3	0/6	5/6	Pancreatite cronica grave
28			0	0	1	1	0/6	2/6	Pancreatite cronica lieve
29	10	controllo	0	0	0-1	0	0/6	0/6	ndr
30	17	controllo	0	0	0-1	0	0/6	0/6	ndr

Legenda: dpi = giorni post infezione; 0 = assente, 1 = grado lieve, 2 = grado moderato, 3 = grado grave; ndr = nulla da rilevare.

Tabella D: Analisi morfometrica di aree positive per l'espressione di glucagone e insulina in relazione alle fasi temporali.

	Glucagone				Insulina			
	Fase precoce	Fase intermedia	Fase tardiva	Controlli	Fase precoce	Fase intermedia	Fase tardiva	Controlli
n	13	8	6	2	13	9	6	1
\bar{x} elementi	71,3	184,6	291,3	104,0	53,7	63,4	98,5	54,0
\bar{x} area (μm^2)	528,51	229,23	719,93	1032,89	757,40	423,92	1000,13	1474,19
s (μm^2)	334,15	86,36	354,26	429,87	341,32	275,17	225,82	-
min (μm^2)	17,07	22,70	24,46	41,28	23,19	24,21	26,76	62,18
max (μm^2)	21747,09	10518,69	58250,45	20508,63	11002,34	11923,00	18722,60	6295,57
pos/tot (%)	0,60	0,73	1,63	0,82	0,46	0,44	1,21	0,96

Tabella E: Analisi morfometrica di aree positive per l'espressione di glucagone e insulina in relazione alla diagnosi morfologica per stadio e gravità.

	Glucagone									
	Acuto lieve	Acuto moderato	Acuto grave	Tot. pancreatiti acute	Cronico lieve	Cronico moderato	Cronico grave	Tot. pancreatiti croniche	Ndr + controlli	
n	4	1	1	6	4	4	7	15	8	
\bar{x} elementi	67,0	16,0	64,0	49,0	323,0	223,5	138,6	228,36	107,0	
\bar{x} area (μm^2)	397,89	486,21	332,73	401,75	612,31	249,89	377,85	406,25	823,19	
s (μm^2)	186,86	-	-	152,78	330,04	101,10	421,85	348,31	456,05	
min (μm^2)	17,33	48,16	24,46	17,33	25,48	28,54	22,70	22,70	17,07	
max (μm^2)	7953,42	2455,19	7054,68	7953,42	58250,45	10518,69	47372,97	58250,45	21747,09	
pos/tot (%)	0,38	0,16	0,13	0,20	1,86	0,93	1,11	1,26	0,64	

	Insulina									
	Acuto lieve	Acuto moderato	Acuto grave	Tot. pancreatiti acute	Cronico lieve	Cronico moderato	Cronico grave	Tot. pancreatiti croniche	Ndr + controlli	
n	4	1	2	7	4	4	7	15	7	
\bar{x} elementi	43,5	43,0	59,0	48,5	99,0	66,8	77,4	81,2	53,4	
\bar{x} area (μm^2)	793,54	1065,94	312,40	694,99	965,05	404,13	569,50	630,88	972,61	
s (μm^2)	378,59	-	-	396,83	209,61	191,80	438,73	385,06	-	
min (μm^2)	46,63	48,93	23,19	23,19	26,76	27,01	24,21	24,21	32,36	
max (μm^2)	5177,42	11002,34	3719,09	11002,34	12505,01	5554,04	18722,60	18722,60	8570,09	
pos/tot (%)	0,39	0,55	0,31	0,39	1,16	0,35	0,72	0,74	0,62	

Legenda: n = numero sezioni appartenenti al campione, \bar{x} elementi = numero di elementi medio per sezione, \bar{x} area= dimensioni medie delle aree positive misurate in μm^2 , s = deviazione standard in μm^2 , min = dimensione minima in μm^2 , max = dimensione massima in μm^2 , pos/tot= rapporto della superficie positiva sulla superficie totale in percentuale.

Ringraziamenti

Desidero ringraziare le dott.sse Valentina Zappulli e Laura Cavicchioli per avermi fatto scoprire la passione per la materia e per avermi dato l'opportunità di coltivarla attraverso il percorso di tesi, senza farmi mai mancare attenzioni e risposte.

Un sentito ringraziamento alla dott.ssa Giorgia Beffagna per i preziosi momenti condivisi in laboratorio e per tutto il tempo dedicatomi con cortesia e disponibilità costanti.

Ringrazio di cuore Rossella, Davide e Enrico, i pilastri del laboratorio, per la gentilezza, la pazienza e l'aiuto, e tutto il personale del dipartimento BCA.

Un grazie speciale alle persone che mi hanno accompagnato lungo i cinque anni di questo percorso, condividendo difficoltà e soddisfazioni.

Il ringraziamento più grande va a mamma e papà, per la fiducia e il sostegno senza i quali non sarei diventata chi volevo essere.

Laura