

Comparazione tra reperti laboratoristici, caratteristiche endoscopiche e distribuzione dei linfociti CD3⁺ nella mucosa duodenale in 45 cani con diagnosi clinica ed istologica di malattia infiammatoria intestinale

RIASSUNTO

Introduzione e scopo del lavoro - L'impiego dell'immunoistochimica ha messo in luce il ruolo patogenetico di vari meccanismi immunologici connessi con l'entità e la distribuzione dell'infiltrato linfocitario intestinale nell'IBD del cane. Lo scopo del presente lavoro è stato quello di valutare la relazione tra i valori sierici di folati e di cobalamina, i rilievi endoscopici e la densità dei linfociti CD3⁺ a livello intraepiteliale e di *lamina propria*.

Materiali e metodi - Lo studio è stato condotto su 45 cani portatori di IBD nei quali sono state valutate le concentrazioni sieriche dei folati e della cobalamina, il quadro endoscopico e la distribuzione dei linfociti CD3⁺ nello strato epiteliale e nella lamina propria della mucosa duodenale con colorazioni immunoistochimiche.

Risultati - I valori sierici dei folati e della cobalamina sono stati pari rispettivamente a $7,91 \pm 5,18 \mu\text{g/L}$ e $317 \pm 216 \text{ ng/L}$. La colorazione immunoistochimica per i linfociti CD3⁺ ha rivelato una densità di $53,9 \pm 32,5/500 \mu\text{m}$ nell'epitelio e $71 \pm 27,1/10000 \mu\text{m}^2$ nella *lamina propria*. L'analisi statistica ha mostrato una correlazione positiva tra linfociti CD3⁺ nell'epitelio e nella *lamina propria* ed una riduzione significativa della cobalamina sierica nei soggetti con infiltrazione epiteliale di grado elevato rispetto a quelli con infiltrazione lieve.

Discussione - La ricerca conferma la bassa specificità/sensibilità dell'endoscopia e delle indagini di laboratorio per la diagnosi di IBD nel cane. I risultati documentano per la prima volta l'esistenza di una correlazione inversa tra la densità dei linfociti CD3⁺ dell'epitelio duodenale ed i livelli sierici di cobalamina nei cani affetti da IBD.

INTRODUZIONE

La Malattia Infiammatoria Intestinale, (IBD - Inflammatory bowel disease) è un termine generico che descrive un disordine del sistema immunitario enterico caratterizzato da segni clinici gastrointestinali, persistenti o ricorrenti, associati al reperto istologico di infiammazione intestinale.

La diagnosi si fonda su dati clinici e di laboratorio (proteina C-reattiva, lipasi pancreatica canina, livelli sierici di folati e di cobalamina) unitamente all'evidenza endoscopica ed istologica di infiltrazione infiammatoria della mucosa intestinale. Nell'iter diagnostico vanno esclusi in particolare i processi infettivi e parassitari enterici, l'insufficienza pancreatica esocrina e le cause di origine non gastroenterica di vomito e di diarrea, nonché i processi neoplastici dell'apparato digerente.

Sulla scorta della risposta clinica al trattamento, è possibile distinguere questa entità nosologica in tre forme: la diarrea dieta responsiva (FRD - food-responsive diarrhea), la diarrea antibiotico responsiva (ARD -

M. Pietra¹, DVM - **E. Nanni**¹, DVM

A. Peli¹, DVM, PhD - **M. Morini**¹, DVM, PhD

F. Bresciani¹, DVM - **P. Famigli Bergamini**¹, DVM

C. Zizzadoro², DVM, PhD

¹ Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie - Alma Mater Studiorum - Università di Bologna, Ozzano dell'Emilia (BO) 40064, Italia

² Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università di Bari, Valenzano (BA) 70010, Italia

“Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione il 12/11/2013 ed accettato per la pubblicazione dopo revisione il 21/11/2013”.

Presentato come abstract al 65th Congresso Nazionale della Società Italiana delle Scienze Veterinarie, Roma, settembre 2012.

antibiotic-responsive diarrhea) e l'enteropatia responsiva agli steroidi (c.d. IBD idiopatica)^{1,2,3}.

Sotto il profilo istologico l'IBD può essere ulteriormente classificata in funzione dell'infiltrato cellulare e l'enterite linfo-plasmocitaria è la forma certamente più frequente mentre quelle eosinofili e granulomatosi sono meno comuni.

Nonostante sia la causa più nota di enteropatia nel cane, la patogenesi dell'IBD non è ancora completamente chiarita, benché numerosi studi abbiano di recente sottolineato il significato patogenetico di vari meccanismi immunologici⁴.

Un aspetto che vale la pena di sottolineare è che la sintomatologia non appare sempre correlata con la gravità dell'infiammazione intestinale rilevata all'esame istologico e, di frequente, l'infiltrazione dell'intestino non risulta uniforme stante il maggior coinvolgimento dell'ileo rispetto al duodeno e digiuno^{5,6}. A rendere ancor più complesso il quadro di questa patologia interviene una non trascurabile discrepanza tra diversi laboratori nell'interpretazione del medesimo campione biotico, come ben documentato da Willard et al.⁷.

Un considerevole ausilio diagnostico è comunque da considerarsi la recente applicazione di tecniche di immunoistochimica finalizzate ad analizzare la popolazione linfocitaria della *lamina propria* e dello strato epiteliale. Le ricerche sino ad oggi condotte in questo campo hanno contribuito a descrivere molti degli aspetti di infiltrazione cellulare che interessano la parete intestinale sia in cani sani^{8,9,10} sia in soggetti con enteropatia¹¹.

In particolare, ciò che emerge da queste ricerche è che la densità linfocitaria della mucosa duodenale è superiore nei cani con IBD rispetto ai sani¹¹, mentre non sembrano sussistere differenze in tal senso tra l'infiltrazione linfocitaria della *lamina propria* di cani con FRD rispetto a quelli affetti da IBD. Merita inoltre di essere evidenziato che, in corso di IBD, non c'è correlazione tra il miglioramento clinico a seguito della terapia e il grado di infiltrazione linfocitaria¹².

Infine, di recente è stata documentata, nei cani con IBD, una relazione tra l'incremento dei linfociti intraepiteliali a livello dell'ileo ed il grado di ipocobalaminemia⁶.

Stante la mancanza di studi comparativi, lo scopo del presente lavoro è stato quello di valutare, in cani con diagnosi clinico-istologica di IBD, la relazione tra i valori sierici di folati e di cobalamina, i rilievi endoscopici e la densità dei linfociti CD3⁺ a livello intraepiteliale (linfociti CD3⁺/500 µm) e di *lamina propria* (linfociti CD3⁺/10000 µm²).

MATERIALI E METODI

Lo studio è stato effettuato su 45 cani con diagnosi clinico-istologica di IBD. I criteri di inclusione comprendevano segni gastrointestinali insorti da

più di 6 settimane, avendo potuto escludere processi infettivi, disordini di origine extraintestinale, insufficienza pancreatica esocrina e neoplasia del tratto digerente.

L'iter diagnostico prevedeva la negatività parassitologica di un esame fecale (elminti intestinali e cisti di *Giardia*), eseguito su campioni prelevati in 3 giorni consecutivi e/o il trattamento antelmintico con fenbendazolo (Panacur®, Intervet Italia, Milano) al dosaggio di 50 mg/kg SID per 5 giorni consecutivi. Il mancato miglioramento clinico a seguito di una dieta ipoallergenica protratta per 3 settimane e di una successiva terapia con tilosina al dosaggio di 15 mg/kg/BID per almeno 3 settimane, permetteva di escludere rispettivamente la FRD e la ARD.

La diagnosi di IBD veniva dunque perfezionata integrando i dati ottenuti dall'esame fisico diretto con i risultati degli esami di laboratorio (esame emocromocitometrico, ematobiochimica, determinazione dei folati e della cobalamina sierica), con il quadro endoscopico enterico e con la diagnosi istologica delle biopsie intestinali.

In particolare in 26 soggetti su 45 venivano analizzate le concentrazioni sieriche pretrattamento dei folati (valore di riferimento 6,50-11,50 µg/L) e della cobalamina (valore di riferimento 250-730 ng/L). Inoltre, al fine di ottenere dati fruibili per una successiva indagine statistica, le registrazioni digitali del duodeno, acquisite durante le endoscopie gastroenteriche (44 su 45 soggetti), venivano rivalutate seguendo i criteri di classificazione riportati dal WSAVA Gastrointestinal Standardization Group¹³, con uno score di gravità variabile da 0 a 3 (0 = normale, 1 = lieve, 2 = moderato, 3 = grave) analizzando le seguenti variabili: 1) distensibilità del lume; 2) iperemia; 3) edema; 4) modificazioni della colorazione della mucosa; 5) friabilità; 6) modificazione della trama della mucosa; 7) presenza di emorragie; 8) presenza di erosioni/ulcere; 9) linfangectasia; 10) contenuto di muco/bile/alimento. Poiché ognuno di questi aspetti ha un significato differente nel disegnare la gravità del quadro endoscopico, gli Autori hanno deciso di modificare a priori i punteggi, applicando un parametro correttivo variabile da 0,1 a 1 cui moltiplicare gli score ottenuti: 1) distensibilità del lume (x 0,1); 2) iperemia (x 0,2); 3) edema (x 0,4); 4) modificazioni della colorazione della mucosa (x 0,5); 5) friabilità (x 0,8); 6) modificazione della trama della mucosa (x 1); 7) presenza di emorragie (x 1); 8) presenza di erosioni/ulcere (x 1); 9) linfangectasia (x 0,8); 10) contenuto di muco/bile/alimento (x 0,2).

Le biopsie della mucosa duodenale, eseguite su 45 soggetti, in numero non inferiore a 8 campioni per soggetto, erano prelevate mediante una pinza biotica endoscopica a cucchiaio senza ago; in 44 soggetti si è proceduto sotto diretta visualizzazione della mucosa, escludendo in questo modo di campionare le placche del Peyer, mentre in un ca-

ne, a causa della difficoltà di superare lo sfintere pilorico, il prelievo era eseguito alla cieca attraverso la valvola.

Una volta prelevate, le biopsie venivano immediatamente poste su una membrana di nitrato di cellulosa per il corretto orientamento dei campioni (Endofilter, Bio-Optica, Milano), fissate in formalina tamponata al 10% per 24 ore, e processate per l'istologia.

Su sezioni seriali dei medesimi campioni erano inoltre allestite colorazioni immunoistochimiche per svelare l'espressione del CD3 nei linfociti T (diluizione 1:10 Leukocyte Antigen Lab, USA). Per lo svelamento antigenico, i campioni erano inizialmente sottoposti a trattamento in forno a microonde in EDTA a pH 8, con 3 passaggi di 5 minuti ciascuno. Quindi le sezioni erano incubate *overnight* a 4° C con l'anticorpo primario CD3, applicando la tecnica streptavidina-biotina-perossidasi con Kit commerciale della Dako (Danimarca). Le sezioni venivano poi incubate con anticorpo secondario (anticorpo *rabbit* IgG coniugato con biotina) per 30 minuti a temperatura ambiente e successivamente con il complesso streptavidina-perossidasi per 25 minuti a temperatura ambiente. Infine, dopo un passaggio di 12 minuti in soluzione DAB (diaminobenzidina 0,02% e 0,001% H₂O₂ in PBS), le sezioni erano risciacquate in PBS e acqua corrente, contro-colorate con ematossilina, disidratate e coperte con DPX (Fluka, Germania)¹⁴. Come controllo positivo era impiegato un linfonodo normale di cane, mentre come controllo negativo l'anticorpo primario era sostituito con siero omologo non immune.

Per analizzare la distribuzione dei linfociti CD3⁺ nello strato epiteliale e nella *lamina propria* della mucosa duodenale ci si è avvalsi di un microscopio ottico, fornito di fotocamera digitale, associata ad un sistema di analisi di immagini (Zeiss, Germania). In particolare, in accordo con il metodo proposto da Christgau et al.¹⁵ e da Peeters et al.¹⁶, almeno 4 sezioni per ogni biopsia erano esaminate per la ricerca di linfociti CD3⁺.

I linfociti CD3⁺ dello strato epiteliale venivano espressi come valore medio in 500 µm di lunghezza del tratto epiteliale, mentre i linfociti CD3⁺ della *lamina propria* erano espressi come valore medio in 10000 µm² di area della *lamina propria*¹⁷. Seguendo la metodica, modificata, proposta da Day et al.¹⁸, il contenuto intraepiteliale di linfociti CD3⁺ era considerato normale per valori di 5-20 linfociti CD3⁺/500 µm, lievemente aumentato per valori di 21-30 linfociti CD3⁺/500 µm, moderatamente aumentato per valori di 31-50 linfociti CD3⁺/500 µm e marcatamente aumentato per valori di 51-100 linfociti CD3⁺/500 µm.

I valori di riferimento relativi alla concentrazione dei linfociti CD3⁺ della *lamina propria* erano parzialmente riferiti agli studi di German et al.⁹ e di Schreiner et al.¹², che esprimevano i linfociti perie-

piteliali e della *lamina propria* rispetto ad unità d'area di 10000 µm². In questo modo, per la *lamina propria* il campione veniva classificato in sei gruppi con crescente concentrazione dei linfociti CD3⁺: gruppo I: ≤15/10000 µm²; gruppo II: 16-25/10000 µm²; gruppo III: 26-35/10000 µm²; gruppo IV: 36-45/10000 µm²; gruppo V: 46-55/10000 µm²; gruppo VI: >55/10000 µm².

L'analisi statistica, era effettuata utilizzando un programma commerciale (Statsoft Inc, USA)¹⁹. In base alla distribuzione normale o non normale delle variabili esaminate, i dati erano espressi rispettivamente come medie ± deviazione standard, o come mediane con scarto interquartile (25-75%).

Un test di Spearman era utilizzato per confrontare lo score endoscopico con i valori sierici di folati e cobalamina, mentre la regressione lineare era impiegata per ricercare eventuali correlazioni tra i valori sierici di folati e cobalamina e tra la concentrazione di linfociti CD3⁺ nell'epitelio e nella *lamina propria*.

Una volta suddiviso il campione in quattro classi, in base alla distribuzione dei linfociti CD3⁺ nello strato epiteliale, i valori di score endoscopico modificato erano confrontati tra loro mediante il test di Kruskal-Wallis. Questo stesso test veniva impiegato per confrontare i valori di score endoscopico modificato tra le sei classi di distribuzione dei linfociti CD3⁺ nella *lamina propria*.

Infine un'analisi di varianza seguita da un test *post hoc* (Least Significant Difference - LSD) era utilizzata per confrontare i valori sierici di folati e di cobalamina, rispettivamente tra le quattro classi di distribuzione intraepiteliale dei linfociti CD3⁺ e tra le sei classi di distribuzione dei linfociti CD3⁺ nella *lamina propria*.

Per tutti i test impiegati, un valore di p<0,05 era considerato statisticamente significativo.

RISULTATI

I valori sierici dei folati prima del trattamento sono stati pari a 7,91 ± 5,18 µg/L (media e deviazione standard) tenendo conto del fatto che il 50% dei soggetti presentava valori al di sotto del normale; i valori sierici pre-trattamento della cobalamina sono stati pari a 317 ± 216 ng/L, con il 58% dei cani con livelli inferiori alla norma.

La mediana e lo scarto interquartile (25-75%) della somma dei parametri analizzati sulla base delle endoscopie gastro-duodenali, secondo la metodica proposta da Washabau et al.¹³, sono stati pari a 11 (5-15), mentre per gli stessi parametri modificati in funzione del coefficiente di gravità, sono stati pari a 6,1 (2,82-9,38) (Tabella 1).

La colorazione immunoistochimica per i linfociti CD3⁺ effettuata sui campioni di mucosa duodenale ha rivelato la presenza di una più o meno im-

TABELLA I
Mediana e scarto interquartile (25-75%) dello score endoscopico duodenale
secondo l'ACVIM Consensus Statement e secondo quanto modificato dagli Autori

	Distensibilità del lume	Iperemia	Edema	Modificazioni della colorazione della mucosa	Friabilità	Modificazione della trama della mucosa	Emorragie	Erosioni/ulcere	Linfangectasia	Muco/bile/alimento	Score totale
Score - ACVIM Consensus Statement	0-3	0-3	0-3	0-3	0-3	0-3	0-3	0-3	0-3	0-3	0-30
Score endoscopico di gravità Mediana (25-75%)	0 (0 - 0,75)	2 (1 - 2)	1 (0,25 - 2)	2 (0,25 - 2)	0 (0 - 2)	3 (2 - 3)	0 (0 - 1)	0 (0 - 0)	0 (0 - 2)	1 (0 - 1)	11 (5 - 15)
Score modificato	Moltiplicato per 0,1	Moltiplicato per 0,2	Moltiplicato per 0,4	Moltiplicato per 0,5	Moltiplicato per 0,8	Moltiplicato per 1	Moltiplicato per 1	Moltiplicato per 1	Moltiplicato per 0,8	Moltiplicato per 0,2	0-18
Score endoscopico di gravità modificato Mediana (25-75%)	0 (0 - 0,08)	0,4 (0,2 - 0,4)	0,4 (0,1 - 0,8)	1 (0,13 - 1)	0 (0 - 0,16)	3 (2 - 3)	0 (0 - 1)	0 (0 - 0)	0 (0 - 1,6)	0,2 (0 - 0,2)	6,1 (2,82-9,38)

nente infiltrazione di linfociti T (epitelio: $53,9 \pm 32,5/500 \mu\text{m}$; lamina propria: $71 \pm 27,1/10000 \mu\text{m}^2$) (Figura 1), coerentemente con la preventiva diagnosi di duodenite linfoplasmocitaria formulata per tutti i 45 cani esaminati. Nello strato epiteliale, le cellule T apparivano distribuite uniformemente tra le cellule epiteliali, mentre nella lamina propria erano localizzate all'interno dei villi. L'entità di infiltrazione nel tessuto perighiandolare, quando era valutabile, è risultata trascurabile. Non sono state evidenziate correlazioni statisticamente significative

tra i livelli sierici di folati, livelli sierici di cobalamina e punteggio endoscopico modificato.

Una correlazione positiva ($p < 0,01$; $r = 0,65$) è stata invece trovata tra linfociti CD3⁺ nell'epitelio e nella lamina propria (Figura 2).

La ridistribuzione dei campioni sulla base della densità intraepiteliale dei linfociti CD3⁺, ha rivelato che è presente una riduzione significativa ($p < 0,05$) della cobalamina sierica (ma non dei folati e dei dati endoscopici) quando si pongono a confronto i casi caratterizzati da una infiltrazione

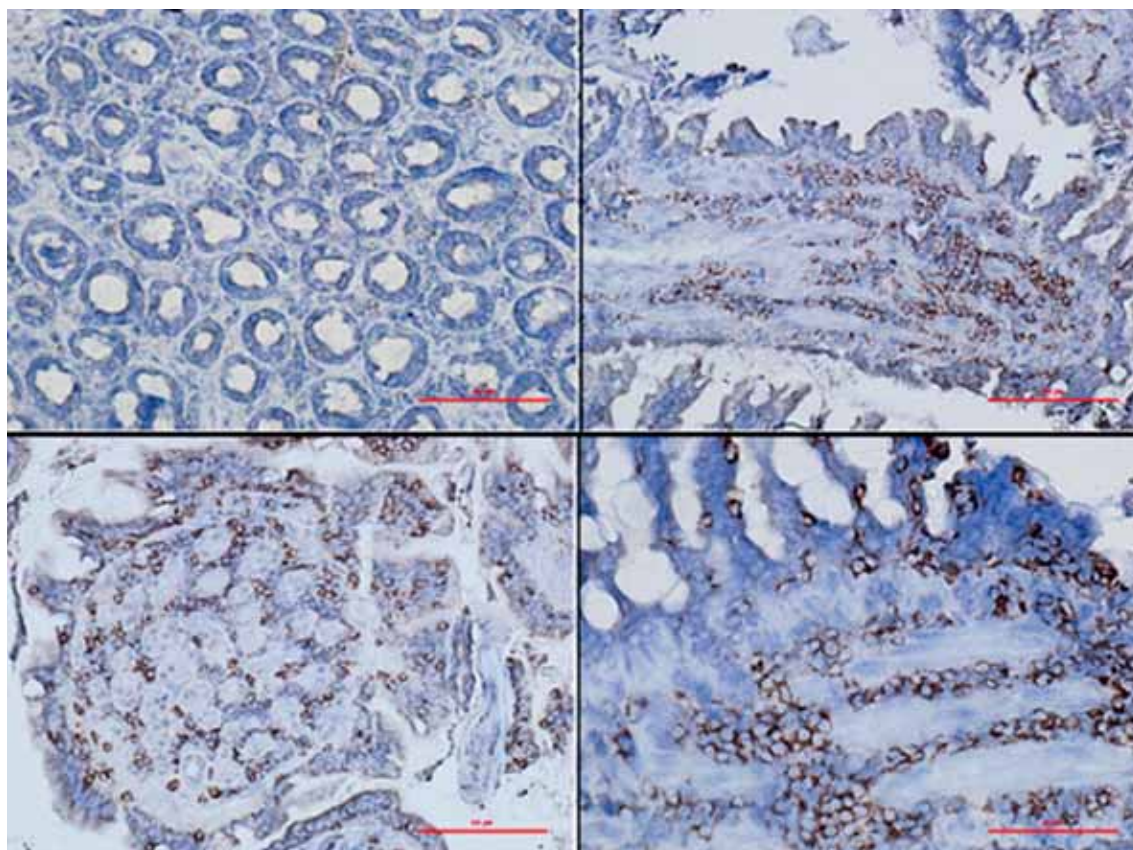


FIGURA 1 - Duodeno di cani portatori di IBD. Colorazione immunoistochimica per CD3. Si nota la marcata immunopositività dei linfociti intraepiteliali e della lamina propria all'anticorpo. (Colorazione di contrasto; barra = 100 μm).

linfocitaria epiteliale lieve (cobalamina: $505 \pm 261,9$ ng/L) con quelli ad infiltrazione di grado elevato (cobalamina: $207,3 \pm 100$ ng/L) (Figura 3). Poiché solo due casi erano rappresentati nel gruppo I (densità intraepiteliale normale di linfociti CD3⁺) non è stato possibile includere questo gruppo nell'analisi statistica.

Infine, non sono state riscontrate differenze significative per alcuna delle tre variabili considerate (folati, cobalamina, punteggio endoscopico modificato) quando si è proceduto a riclassificare il campione in relazione alla densità di linfociti CD3⁺ nella lamina propria.

DISCUSSIONE

Nel cane sono note diverse patologie multifattoriali, come l'IBD, che riconoscono una predisposizione genetica^{20,21}.

La diagnosi di IBD nel cane richiede valutazioni cliniche, laboratoristiche, endoscopiche ed istologiche²². Analogamente a quanto avviene in campo umano in cui non è disponibile alcuna procedura o tecnica che da sola possa avere valore diagnostico assoluto per il morbo di Crohn e la colite ulcerativa²³, anche in medicina veterinaria a tutt'oggi non è noto un marker specifico per l'IBD, tanto che i risultati degli studi clinici spesso non sono in accordo gli uni con gli altri³.

In particolare, né caratteristiche cliniche né endoscopiche possono essere considerate specifiche per l'IBD nel cane, sebbene Suchodolski and Steiner²⁴ riferiscano che, una volta stabilito un corretto iter diagnostico, le alterazioni dei livelli sierici di folati e cobalamina possono essere considerate altamente suggestive di malattia del piccolo intestino, a patto che l'immunoreattività tripsino simile sierica (serum trypsin-like immunoreactivity - TLI) sia normale.

D'altro canto, va sottolineato che bassi livelli sierici di folati e di cobalamina nel nostro studio sono stati osservati esclusivamente nel 50% e nel 58% dei soggetti rispettivamente.

Qualche altro parametro, quale la proteina C-reattiva potrebbe rappresentare un marker sensibile, ma non specifico, per l'IBD nel cane; esso sarebbe perciò di qualche utilità per stabilire la risposta terapeutica piuttosto che ai fini diagnostici²⁵, una volta che siano state eliminate altre cause di infiammazione.

Neppure l'istologia appare essere un marker sensibile e specifico di IBD, sia a motivo della difficoltà di acquisire adeguate biopsie per via endoscopica, sia per la scarsa ripetibilità della stessa diagnosi istologica^{7,26}.

Di maggior utilità per la diagnosi di IBD nel cane appare la valutazione dell'infiltrazione linfocitaria nella lamina propria e nello strato epiteliale per mezzo di metodiche immunohistochemiche^{11,12,27,28} o istologiche⁶.

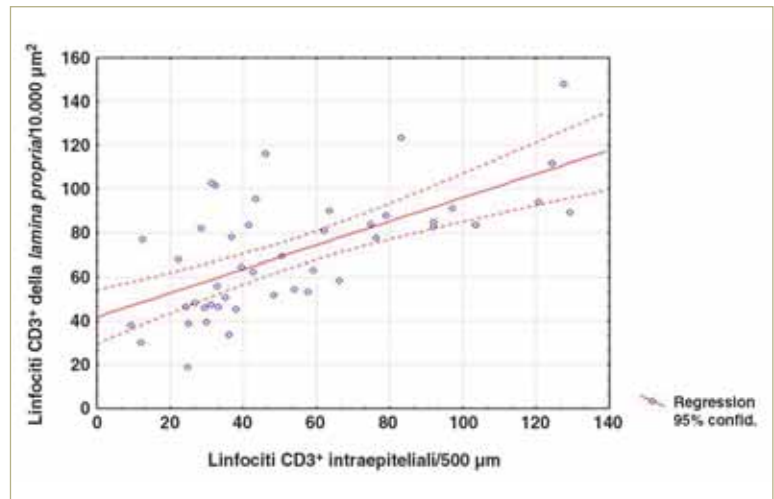


FIGURA 2 - Regressione lineare tra i linfociti intraepiteliali CD3⁺/500 µm e i linfociti CD3⁺ della lamina propria/10000 µm² ($p < 0,01$; $r: 0,65$).

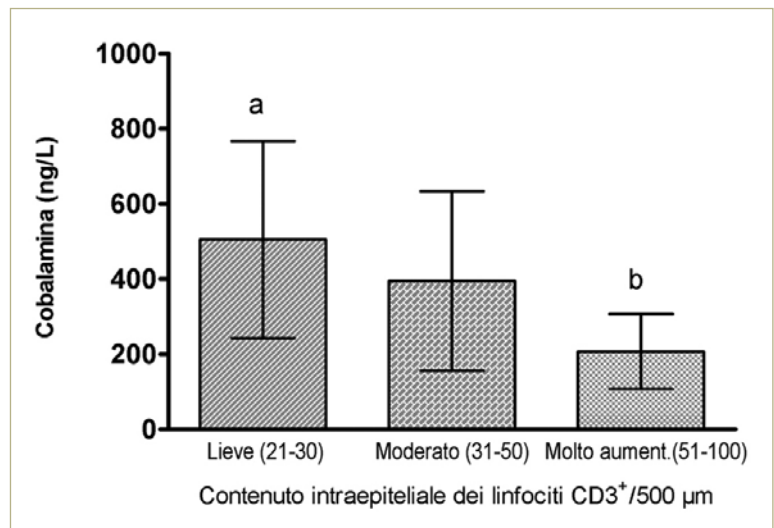


FIGURA 3 - Media e deviazione standard della cobalamina sierica in relazione alla concentrazione intraepiteliale dei linfociti CD3⁺. Analisi di varianza e LSD Test. Lettere differenti indicano una differenza significativa ($p < 0,05$) tra i gruppi.

Questa condizione potrebbe dipendere dalla deregolazione dell'omeostasi immunitaria intestinale in grado di causare un aumento dell'infiltrato di cellule T che sovraccarica la normale popolazione linfocitaria nella mucosa intestinale¹². D'altra parte, va ricordato che mentre la presenza di linfociti nella mucosa duodenale aumenta in corso di IBD, non si assiste ad un calo di essi a seguito di successo terapeutico²⁹.

Dal momento che i linfociti intraepiteliali presenti nel piccolo intestino in caso di IBD canina sono rappresentati essenzialmente da linfociti CD3⁺, come documentato da Luckhsander et al.³⁰, è possibile fare una comparazione tra i risultati ottenuti nel nostro studio, in cui è stata usata una tecnica immunohistochemica ricercando l'antigene CD3⁺, e quelli scaturiti da ricerche nelle quali la determinazione dei linfociti è stata fatta con tecniche istologiche⁶.

La nostra ricerca evidenzia in primo luogo la mancanza di relazioni tra reperti endoscopici (sia adottando i punteggi proposti dal WSAVA Gastrointestinal Standardization Group¹³ sia impiegando i punteggi da noi modificati) e gli altri parametri esaminati (folati, cobalamina e linfociti CD3⁺ nell'epitelio intestinale e nella *lamina propria*), in pieno accordo con la bassa sensibilità e specificità attribuita alla diagnosi endoscopica di IBD nel cane²⁵.

Inoltre, l'incremento da noi osservato del numero di linfociti CD3⁺ a livello epiteliale e di *lamina propria* in cani con IBD, così come la distribuzione proporzionale dei linfociti nei due settori della parete dell'intestino, concorda con quanto già noto^{11, 18, 28}. Certamente di maggior interesse è la significativa riduzione della cobalamina sierica registrata nei cani con un'infiltrazione intraepiteliale di linfociti CD3⁺ di grado elevato (gruppo IV: 51-100 linfociti CD3⁺ intraepiteliali/500 µm) rispetto alla classe di soggetti con infiltrazione intraepiteliale di grado lieve (gruppo II: 21-30 linfociti CD3⁺ intraepiteliali/500 µm).

È interessante notare che questa relazione tra la densità intraepiteliale di linfociti CD3⁺ e la cobalamina sierica è indipendente dai valori di riferimento adottati nel nostro studio (250 ng/L) i quali peraltro differiscono da quelli riportati in letteratura^{1, 31, 32}.

Inoltre, appare di grande interesse evidenziare che il nostro studio ha preso in esame esclusivamente biopsie duodenali, mentre la cobalamina è assorbita prevalentemente a livello ileale; queste considerazioni sembrano consentire di ipotizzare l'esistenza di una correlazione tra l'infiltrazione linfocitaria nell'epitelio del duodeno e la capacità assorbitiva della cobalamina da parte dell'ileo, in palese contrasto con la fin qui asserita scarsa concordanza tra i reperti istopatologici a livello di duodeno ed ileo, essendo le alterazioni in corso di IBD canina principalmente descritte in quest'ultimo tratto intestinale^{5, 6}.

Parimenti, nell'uomo è riportato che diverse malattie che classicamente colpiscono l'ileo ed il colon, quali il morbo di Crohn, la colite ulcerativa e la colite linfocitaria, possono essere associate a linfocitosi intraepiteliale duodenale, e questo reperto, almeno per il morbo di Crohn, può anche precedere la forma infiammatoria acuta³³.

In conclusione, il nostro studio mette in evidenza una non ancora sin qui descritta correlazione inversa tra la densità dei linfociti CD3⁺ dell'epitelio duodenale ed i livelli sierici di cobalamina nei cani affetti da IBD. Per contro, la ricerca ha consentito di trovare conferma dell'assenza di correlazioni tra gli aspetti endoscopici, i valori sierici di folati e di cobalamina e la concentrazione dei linfociti CD3⁺ della *lamina propria* del duodeno.

Da questi risultati scaturiscono pertanto i presupposti per ulteriori ricerche per approfondire entità e distribuzione dell'infiltrato intraepiteliale dei linfociti CD3⁺ lungo l'intero intestino tenue. Qua-

lora venisse documentata una correlazione tra l'infiltrazione intraepiteliale linfocitaria duodenale e quella ileale, la valutazione dei linfociti CD3⁺ intraepiteliali del tratto duodenale potrebbe assumere valore diagnostico per l'IBD nel cane.

Parole chiave

Cane, Linfociti CD3⁺, Istopatologia, Malattia infiammatoria intestinale (IBD).

■ Comparison between laboratory findings, endoscopic features and CD3⁺ lymphocytes distribution in the layer of duodenal mucosa in 45 dogs with clinical/histological diagnosis of inflammatory bowel disease

Summary

Introduction - A diagnostic improvement in the diagnosis of canine IBD has been found by applying the techniques of immunohistochemistry to highlight the lymphocyte population of intestinal mucosa. The aim of the study was to compare in 45 dogs with IBD the endoscopic features, serum folate and cobalamin values, and CD3⁺ lymphocytes concentration of duodenal epithelium and *lamina propria*.

Materials and methods - Forty-five dogs with clinical and histologic diagnosis of IBD were included in the study. To compare endoscopic score with serum folate and serum cobalamin was applied a Spearman's test, linear regression was used to analyse the correlation between folate and cobalamin, and between CD3⁺ lymphocytes concentration in the epithelium and in *lamina propria*, and the comparison of folate and cobalamin between the classes according to the duodenal CD3⁺ intraepithelial lymphocytes distribution and to the duodenal CD3⁺ *lamina propria* lymphocytes distribution, was performed by an analysis of variance followed by a post hoc test (Least Significant Difference - LSD test).

Results - A significant correlation ($p < 0.01$ $r = 0.65$) between intraepithelial and *lamina propria* CD3⁺ lymphocytes was found. A significant reduction ($p < 0.05$) of serum cobalamin was recorded, after sample subdivision according to average number of CD3⁺ intraepithelial lymphocytes/500 µm, between mild to severe class of lymphocytic infiltration.

Discussion - The study confirming the lack of relationship between endoscopic features, folate, cobalamin and CD3⁺ lymphocytes in duodenal *lamina propria*, and the relationship between cobalamin and CD3⁺ lymphocytes in duodenal epithelial layer.

Key words

Dog, CD3⁺ lymphocytes, Histopathology, Inflammatory Bowel Disease.

BIBLIOGRAFIA

1. Allenspach K, Wieland B, Gröne A et al. Chronic enteropathies in dogs: Evaluation of risk factors for negative outcome. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 21: 700-708, 2007.
2. German AJ, Hall EJ, Day MJ. Chronic intestinal inflammation and intestinal disease in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 17: 8-20, 2003.
3. Simpson KW, Jergens AE. Pitfalls and progress in the diagnosis and management of canine inflammatory bowel disease. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 41: 381-398, 2011.
4. Allenspach K. Clinical immunology and immunopathology of the canine and feline intestine. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 41: 345-360, 2011.
5. Casamian-Sorrosal D, Willard MD, Murray JK et al. Comparison of histopathologic findings in biopsies from the duodenum and ileum of dogs with enteropathies. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 24: 80-83, 2010.
6. Procoli F, Mötsküla PF, Keyte SV, Priestnall S et al. Ileal endoscopic biopsies in dogs with chronic small intestinal enteropathies. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 27: 268-274, 2013.
7. Willard MD, Jergens AE, Duncan RB et al. Interobserver variation among histopathologic evaluations of intestinal tissues from dogs and cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 220: 1177-1182, 2002.
8. Elwood CM, Hamblin AS, Batt RM. Quantitative and qualitative immunohistochemistry of T cell subsets and MHC Class II expression in the canine small intestine. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 58, 195-207, 1997.
9. German AJ, Hall EJ, Day MJ. Analysis of leucocyte subsets in the canine intestine. *Journal of Comparative Pathology* 120: 129-145, 1999.
10. Sonea IM, Jergens AE, Sacco RE et al. Flow cytometric analysis of colonic and small intestinal mucosal lymphocytes obtained by endoscopic biopsy in the healthy dog. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 77: 103-119, 2000.
11. German AJ, Hall EJ, Day MJ. Immune cell population within the duodenal mucosa of dogs with enteropathies. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 15: 14-25, 2001.
12. Schreiner NMS, Gaschen F, Gröne A et al. Clinical signs, histology, and CD3-positive cell, before and after treatment of dogs with enteropathies. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 22: 1079-1083, 2008.
13. Washabau RJ, Day MJ, Willard MD et al. Endoscopic, biopsy and histopathologic guidelines for the evaluation of gastrointestinal inflammation in companion animals. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 24: 10-26, 2010.
14. Morini M, Gentilini F, Pietra M et al. Cytological, immunohistochemical and mutational analysis of a gastric Gastrointestinal Stromal Tumour in a cat. *Journal of Comparative Pathology* 145: 152-157, 2011.
15. Christgau M, Caffesse RG, Newland JR et al. Characterization of immunocompetent cells in the disease canine periodontium. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 46, 1443-1454: 1998.
16. Peeters JR, Helps CR, Calvert EL et al. Cytokine mRNA quantification in histologically normal canine duodenal mucosa by real-time RT-PCR. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 103: 101-111, 2005.
17. Kleinschmidt S, Meneses F, Nolte I et al. Characterization of mast cell numbers and subtypes in biopsies from the gastrointestinal tract of dogs with lymphocytic-plasmacytic or eosinophilic gastroenterocolitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 120: 80-92, 2007.
18. Day MJ, Bilser T, Mansell J et al. Histopathological standards for the diagnosis of gastrointestinal inflammation in endoscopic biopsy samples from the dog and cat: a report from the World Small Animal Veterinary Association - Gastrointestinal Standardization Group. *Journal of Comparative Pathology* 138: S1-S43, 2008.
19. Mariella J, Castagnetti C, Peli A et al. Mucosal mRNA cytokines' profile of gastric wall in neonatal foals: comparison with endoscopy and histology. *Journal of Equine Veterinary Science* 2013, 33: 977-983.
20. Guglielmini C, Diana A, Pietra M et al. Atrial septal defect in five dogs. *Journal of Small Animal Practice* 43: 317-322, 2002.
21. Kathrani A, Werling D, Allenspach K. Canine breeds at high risk of developing inflammatory bowel disease in the south-eastern UK. *Veterinary Record* 169, 635, 2011. doi: 10.1136/vr.d5380.
22. Pietra M, Fracassi F, Diana A, et al. Plasma concentrations and therapeutic effects of budesonide in dogs with inflammatory bowel disease. *American Journal of Veterinary Research* 74: 78-83, 2013.
23. Stange EF, Travis SP, Vermeire S et al. European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: definitions and diagnosis. *Gut* 55: i11-i15, 2006.
24. Suchodolski JS, Steiner JM. Laboratory assessment of gastrointestinal function. *Clinical Techniques in Small Animal Practice* 18: 203-210, 2003.
25. Jergens AE. Clinical assessment of disease activity for canine inflammatory bowel disease. *Journal of the American Animal Hospital Association* 40: 437-445, 2004.
26. McCann TM, Ridyard A E, Else RW et al. Evaluation of disease activity markers in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. *Journal of Small Animal Practice* 48: 620-625, 2007.
27. Cave NJ. Chronic inflammatory disorders of the gastrointestinal tract of companion animals. *New Zealand Veterinary Journal* 51: 262-274, 2003.
28. Jergens AE, Moore FM, Kaiser MS et al. Morphometric evaluation of immunoglobulin A-containing and immunoglobulin G-containing cells and T cells in duodenal mucosa from healthy dogs and from dogs with inflammatory bowel disease or nonspecific gastroenteritis. *American Journal of Veterinary Research* 57: 697-704, 1996.
29. Allenspach K, Rüfenacht S, Sauter S et al. Pharmacokinetics and clinical efficacy of cyclosporine treatment of dogs with steroid-refractory inflammatory bowel disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 20: 239-244, 2006.
30. Luckschander N, Pfammatter NS, Sidler D et al. Phenotyping, functional characterization, and developmental changes in canine intestinal intraepithelial lymphocytes. *Veterinary Research* 40: 58, 2009. doi: 10.1051/vetres/2009042.
31. Berghoff N, Parnell NK, Hill SL et al. Serum cobalamin and methylmalonic acid concentrations in dogs with chronic gastrointestinal disease. *American Journal of Veterinary Research* 74: 84-89, 2013.
32. Craven M, Simpson JW, Ridyard AE et al. Canine inflammatory bowel disease: retrospective analysis of diagnosis and outcome in 80 cases (1995-2002). *Journal of Small Animal Practice* 45, 336-342, 2004.
33. Brown I, Mino-Kenudson M, Deshpande V et al. Intraepithelial lymphocytosis in architecturally preserved proximal small intestinal mucosa. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 130: 1020-1025, 2006.