

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE VETERINARIE**

Ciclo XXIX

Settore Concorsuale di afferenza: 07/H4

Settore Scientifico disciplinare: VET08

MALATTIE GENETICHE DEL BOVINO

Presentata da: Dott.ssa Marilena Bolcato

Coordinatore Dottorato

Relatore

Professor Aracangelo Gentile

Professor Aracangelo Gentile

Esame finale anno 2017

INDICE

PARTE PRIMA: INTRODUZIONE

Capitolo 1 LA MALATTIA GENETICA.....	7
1.1 Classificazione delle malattie genetiche.....	7
1.1.1 Malattie Da Anomalie Cromosomiche.....	8
1.1.2 Malattie Monogeniche Ad Eredità Mendeliana.....	8
1.1.3 Malattie Poligeniche E Multifattoriali.....	10
1.1.4 Malattie Mitocondriali.....	10
1.2 Approccio clinico alla malattia genetica.....	11
1.2.1 Raccolta Dei Dati Anamnestici.....	11
1.2.2 Costruzione Dell'albero Genealogico.....	12
1.2.3 Inquadramento Diagnostico E Test Genetici.....	13

PARTE SECONDA ESPERIENZA PERSONALE

Capitolo 2 STUDIO CLINICO E GENETICO DI NUOVE MALATTIE.....18

2.1. La cataratta ereditaria nella razza Romagnola.....18

2.1.1 Casistica Osservata.....19

2.1.2 Quadro Clinico.....20

2.1.3 Studio Del Pedigree.....23

2.1.4 Studio Del Genotipo.....24

2.1.5 Considerazioni.....24

2.2 Il nanismo condrodisplastico nella razza Grigio Alpina.....26

2.2.1 Cenni Di Sviluppo Dell'accrescimento In Lunghezza Del Tessuto Osseo.....28

2.2.2. Casistica Osservata.....29

2.2.3 Quadro Clinico.....30

2.2.4 Quadro Anatomoistopatologico.....32

2.2.5 Quadro Immunoistochimico.....33

2.2.6 Studio Del Pedigree.....34

2.2.7 Studio Del Genotipo.....35

2.2.8 Considerazioni.....35

2.3 La xantinuria nella razza Grigio Alpina.....	36
2.3.1 Casistica Osservata.....	37
2.3.2 Quadro Clinico.....	38
2.3.3 Quadro Ematobiochimico.....	39
2.3.4 Analisi Degli Uroliti.....	39
2.3.5 Quadro Anatomopatologico.....	40
2.3.6 Studio Del Pedigree.....	41
2.3.7 Studio Del Genotipo.....	42
2.3.8 Considerazioni.....	42

**Capitolo 3 SORVEGLIANZA SU MALATTIE A SOSPETTA BASE
GENETICA: LE FORME SPASTICHE.....43**

3.1 Richiami di morfo-fisiologia del sistema neuro-muscolare.....44

3.2 La Sindrome Spastica nella razza Frisona Italiana.....52

3.2.1 Ezio-Patogenesi.....	52
3.2.2 Quadro Dismorfico.....	53
3.2.3 Diagnosi Differenziale.....	55
3.2.4 Prognosi E Approccio Terapeutico.....	56
3.2.5 Casistica Osservata.....	57
3.2.6 Quadro Clinico.....	59

3.2.7 Quadro Ematobiochimico Ed Emogasanalitico.....	61
3.2.8 Studio Del Pedigree.....	62
3.2.9 Studio Del Genotipo.....	63
3.2.10 Considerazioni.....	63
3.3 La Paresi Spastica nella razza Romagnola.....	64
3.3.1 Ezio-Patogenesi.....	65
3.3.2 Quadro Dismorfico.....	67
3.3.3 Quadro Diagnostico.....	70
3.3.4 Quadro Anatomopatologico.....	71
3.3.5 Diagnosi Differenziale.....	71
3.3.6 Approccio Terapeutico.....	72
3.3.7 Casistica Osservata.....	73
3.3.8 Quadro Clinico.....	74
3.3.9 Quadro Elettromiografico.....	78
3.3.10 Studio Del Pedigree.....	78
3.3.11 Studio Del Genotipo.....	78
3.3.12 Considerazioni.....	78

Capitolo 4 DISCUSSIONE.....	80
Capitolo 5 BIBLIOGRAFIA.....	81
Capitolo 6 PUBBLICAZIONI SCIENTIFICHE.....	90
Ringraziamenti.....	92

PARTE PRIMA:
INTRODUZIONE

Capitolo 1

LA MALATTIA GENETICA

Lo sviluppo regolare degli individui è mantenuto dalla costanza con la quale il materiale genetico si mantiene stabile da una generazione all'altra, tuttavia nell'ambito di una specie si producono numerose variazioni individuali.

La genetica trova la sua ragion d'essere nello studio di queste variazioni o differenze e la genetica patologica studia quelle variazioni individuali che si possono esprimere in forme morbose apprezzabili clinicamente o soltanto con indagini biochimiche, oppure che determinano una diversa reattività individuale alle condizioni ambientali.

Le modificazioni nella costituzione ereditaria di una cellula possono essere a carico dei geni, di un singolo cromosoma, oppure di parte o di tutto il genoma; possono essere inoltre gametiche o somatiche. Le prime interessano le cellule germinali e perciò sono soggette a trasmissione ereditaria. Le seconde interessano le cellule somatiche e, a meno che non colpiscano una cellula embrionale dalla quale derivano anche cellule germinali, non sono soggette a trasmissione ereditaria.

1.1 Classificazione delle malattie genetiche

Le malattie genetiche possono essere classificate in (Meozzi, 2013):

- malattie da anomalie cromosomiche;
- malattie monogeniche ad eredità mendeliana;
 - autosomiche dominanti (AD);
 - autosomiche recessive (AR);
 - legate al sesso (X linked);
- malattie poligeniche e multifattoriali;
- malattie mitocondriali.

1.1.1 Malattie Da Anomalie Cromosomiche

Questo tipo di patologia è determinato dalla alterazione del *numero* o della *struttura* dei cromosomi. Le poliploidie sono caratterizzate dalla presenza di cromosomi soprannumerari; le monosomie dalla perdita di un cromosoma.

Nel bovino i vari tipi di traslocazioni autosomiche, in alcune razze, portano a diminuita fertilità degli eterozigoti, ma non ad anomalie morfologiche. Delle aneuploidie e delle loro conseguenze patologiche fino ad oggi è conosciuta solo la trisomia 18 del bovino. Sono state riscontrate poliploidie (tetra- fino a decaploidie) in vari difetti congeniti del sistema nervoso centrale del bovino, come pure nei vitelli a doppia groppa della razza Charolais. Anomalie numeriche dei cromosomi sessuali hanno come conseguenza disturbi della realizzazione sessuale, i quali portano a malformazioni degli organi sessuali con condizioni intersessuali di vario tipo (Richter e Götze, 1986).

1.1.2 Malattie Monogeniche Ad Eredità Mendeliana

La patologia genica monofattoriale viene anche definita mendeliana in quanto riconosce meccanismi ereditari che già Mendel aveva evidenziato con i suoi famosi esperimenti sui piselli. Tutte le funzioni o caratteri genetici sono determinati da due geni; ognuno di essi deriva da un genitore, il quale contribuisce per metà al patrimonio genetico della prole. In uno stesso individuo, ogni gene è rappresentato da due alleli, uguali o diversi. I due geni per una stessa funzione o carattere sono posizionati nello stesso locus dei due cromosomi omologhi, provenienti ciascuno da un genitore; essi possono essere normali o patologici, identici, nel qual caso l'individuo viene definito omozigote per quel carattere, oppure diversi (ambedue normali ma rappresentati da due varianti diverse, uno normale e l'altro patologico o ambedue patologici ma con due difetti diversi). In tale ultimo caso l'individuo è definito eterozigote per quel carattere. Ogni gene possiede, nell'ambito sia della normalità che della patologia, una o più condizioni alternative, gli alleli, cioè versioni diverse dello stesso gene.

Malattie autosomiche dominanti (AD)

Queste malattie sono dovute a un difetto di un gene localizzato su un autosoma; esse si esprimono nel fenotipo anche nel soggetto eterozigote. La modalità di trasmissione è di

tipo *verticale*, cioè di solito la malattia si presenta in più generazioni. Con un genitore affetto, il rischio di malattia per i figli è del 50%, indipendentemente dal sesso.

Nel meccanismo di trasmissione delle malattie AD occorre considerare alcune irregolarità che possono complicare la possibilità di diagnosi. Un primo aspetto è costituito dalla *penetranza* di un carattere: essa determina la percentuale di individui con un determinato genotipo che manifesta il fenotipo corrispondente. Un altro meccanismo da ricordare è quello della *espressività*, fenomeno questo non limitato alle sole malattie AD. Infatti trattasi di un fenomeno proprio di tutti i geni e di tutti i caratteri, sia normali che patologici. Per tale meccanismo una stessa mutazione può dar luogo a gradi diversi di espressione clinica, e ciò anche in membri di una stessa famiglia. Inoltre, alcune condizioni AD si presentano spesso in maniera sporadica in quanto dovute a nuove mutazioni.

Malattie autosomiche recessive (AR)

I soggetti affetti da queste malattie sono omozigoti per un dato difetto genetico. Il soggetto eterozigote con il 50% di attività proteica sufficiente ad assicurare la normalità della funzione interessata, risulta fenotipicamente, cioè clinicamente, normale. La modalità di trasmissione, in matrimoni tra soggetti eterozigoti portatori dello stesso tipo di malattia, è di tipo *orizzontale*, determina cioè la possibilità di due o più figli affetti nella stessa fratria. Il rischio per i genitori portatori sani eterozigoti di avere figli affetti è del 25%; di avere figli sani del 25%; di avere figli portatori sani del 50%, indipendentemente dal sesso della prole. La frequenza di accoppiamenti consanguinei nelle malattie di questo tipo è più elevata che nella popolazione generale: chi ha antenati in comune ha maggior probabilità di avere geni in comune, buoni o meno buoni. I geni che causano letalità allo stato omozigote non vengono particolarmente selezionati poichè vengono trasmessi e disseminati nella popolazione dai portatori sani.

Malattie legate al sesso (X-linked)

Queste malattie sono determinate da geni localizzati sul cromosoma X, quasi tutte recessive. Poichè nella femmina esistono due cromosomi X e nel maschio uno solo, ciò spiega il meccanismo di trasmissione: il difetto cioè è trasmesso dalla femmina portatrice sana (meccanismo di trasmissione diagenico) e si manifesta, salvo casi particolari, solo nei maschi. Per una madre portatrice sana la probabilità di avere figli maschi affetti sarà

del 50%, identica a quella di avere figli maschi sani; mentre per le figlie femmine la probabilità di essere portatrici sane sarà del 50%, pari a quella di essere non portatrici. I maschi affetti non trasmettono la malattia ai figli maschi, ma trasmettono il gene difettoso, localizzato nel cromosoma X, a tutte le figlie femmine.

Nel bovino sono riconosciute come malattie genetiche legate al sesso la displasia anidrotica ectodermica e la sindrome da femminilizzazione testicolare (Richter e Götze, 1986).

1.1.3 Malattie Poligeniche E Multifattoriali

Queste malattie prevedono, per la loro insorgenza, il concorso di numerosi geni e di fattori ambientali. Pertanto non si riscontra il modello di ereditarietà di tipo mendeliano, anche se è comune il riscontro di una loro maggior frequenza in determinati ceppi familiari. Ciò significa che i fattori genetici possono costituire una condizione di predisposizione allo sviluppo della malattia.

La manifestazione di un carattere patologico determinata poligenicamente si ha soltanto dopo l'incontro (accumulazione) dei geni deleteri necessari al genoma dell'individuo interessato e dopo l'influenza di fattori esogeni delle più svariate categorie (Götze,).

Tra gli agenti teratogeni di origine ambientali vanno annoverati agenti infettivi, piante tossiche, agenti chimici compresi farmaci o residui, deficienze nutrizionali od errori alimentari, agenti fisici come radiazioni o traumi (Noden e De Lahunta, 1991).

1.1.4 Malattie Mitocondriali

I mitocondri sono le uniche particelle citoplasmatiche dotate di un proprio DNA (mtDNA) distinto dal DNA nucleare (nDNA), la cui funzione è deputata soprattutto al metabolismo ossidativo. La mutazione può essere presente in tutti i mitocondri della cellula (omoplasmia) o solo in una frazione di questi (eteroplasmia). Durante la mitosi i mitocondri si distribuiscono a caso nelle cellule figlie. Per questo motivo se una cellula contiene una frazione di mitocondri mutati, le cellule figlie potranno contenere esclusivamente mitocondri mutati, non mutati o di entrambi i tipi. Quando viene raggiunto il livello critico di mtDNA, tale da determinare una caduta energetica al di sotto di un valore soglia, si rende manifesto il deficit energetico ed il fenotipo patologico

(effetto soglia). La variabilità genotipica e le caratteristiche multisistemiche della compromissione giustificano la notevole variabilità fenotipica presente in questo tipo di patologia. Il DNA mitocondriale viene ereditato esclusivamente dalla madre; infatti al momento della fecondazione nessun apporto mitocondriale è dovuto allo spermatozoo, la cui testa è sprovvista di citoplasma. La trasmissione è pertanto di tipo matrilineare. Date le sopra accennate caratteristiche genetiche e di trasmissione ereditaria resta ancor oggi problematico definire con quale probabilità un soggetto svilupperà una malattia e stabilire il rischio di ricorrenza.

1.2 Approccio clinico alla malattia genetica

Nella pratica professionale buiatica qualora si riscontri la ripetuta comparsa di un certo tipo di malformazione nei discendenti di uno stesso toro, anche se appartenenti ad allevamenti diversi o pur soltanto nella stessa famiglia di vacche, oltre a tenere nella dovuta considerazione la possibilità di cause di origine esogena, si dovrà supporre che con notevole probabilità si tratti di un'anomalia ereditaria (Richter e Götze, 1986).

Gli elementi fondamentali che costituiscono il nucleo dell'approccio clinico "genetico" sono rappresentati: dallo studio degli aspetti clinici e diagnostici, senza tralasciare la raccolta dei dati anamnestici familiari con la compilazione dell'albero genealogico; dalla individuazione delle modalità di trasmissione ereditaria, con la conseguente stima del rischio di ricorrenza; dal processo comunicativo ed empatico con i consultandi, che deve includere la spiegazione delle opzioni disponibili e dei provvedimenti terapeutici (Rantanen et al., 2008).

1.2.1 Raccolta Dei Dati Anamnestici

L'interrogatorio anamnestico, soprattutto quando include la possibilità di tare genetiche, deve essere proposto con una linea di condotta seria, dignitosa e serena, al fine di acquistare fiducia e confidenza con la persona con la quale è necessario trattare.

Si devono considerare innanzitutto elementi anamnestici di ordine ambientale e collettivo prima di entrare nel particolare dei dati relativi all'individuo o agli individui malati (Messieri e Moretti, 1982).

L'*anamnesi ambientale* rappresenta lo studio dell'ambiente, in cui vive l'animale, inteso in senso lato. Se gli animali sono tenuti allo stato brado o a stabulazione permanente o al pascolo, a quale scopo vengono allevati, se vengono alimentati con prodotti naturali o con concentrati o con insilati, può voler dire qualcosa di significativo in campo clinico.

Con *anamnesi collettiva* si allude ai rapporti che sussistono tra gli animali ammalati e gli altri presenti nella stessa stalla o comunque vicini, della stessa specie o di altra.

L'*anamnesi individuale remota* riguarda innanzi tutto la genealogia dell'animale in esame. Grande valore deve essere dato ai fattori ereditari in senso stretto, relativi alla trasmissione di particolari tare organiche o caratteristiche somatiche, ma anche alla possibilità di trasmissione di caratteri di predisposizione a certe malattie infettive o di apparati, senza escludere la trasmissione diretta transplacentare di talune infezioni. L'*anamnesi remota* riguarda poi la storia del soggetto in riferimento al suo sviluppo e alla sua carriera e cioè ad allattamento, svezzamento, malattie subite, trattamenti ricevuti, interventi immunizzanti.

Nell'*anamnesi recente* particolare attenzione andrà riservata al momento di comparsa della malattia, alla sua manifestazione primaria e alla sua evoluzione e a informazioni inerenti gli interventi terapeutici eseguiti per suggerimento o prescrizione.

1.2.2 Costruzione Dell'albero Genealogico

A partire dal caso-indice viene ricostruito l'albero genealogico della famiglia su quante più generazioni possibile, cercando di trarre tutte le informazioni fenotipiche utili sui componenti della famiglia.

In pratica, l'albero genealogico o pedigree, è la rappresentazione sistematica della storia familiare attraverso l'uso di simboli standardizzati (Fig.1). L'analisi del pedigree permette di determinare se il carattere ha una modalità di trasmissione recessiva o dominante, e se il gene in questione è localizzato su un autosoma o su un cromosoma sessuale.

In base all'analisi del pedigree è possibile stimare il rischio di ricorrenza, ovvero la possibilità che la condizione patologica a base genetica presente nell'albero genealogico

si manifesti in altri discendenti. Il calcolo del rischio si basa sull'accertamento della modalità di trasmissione della malattia.

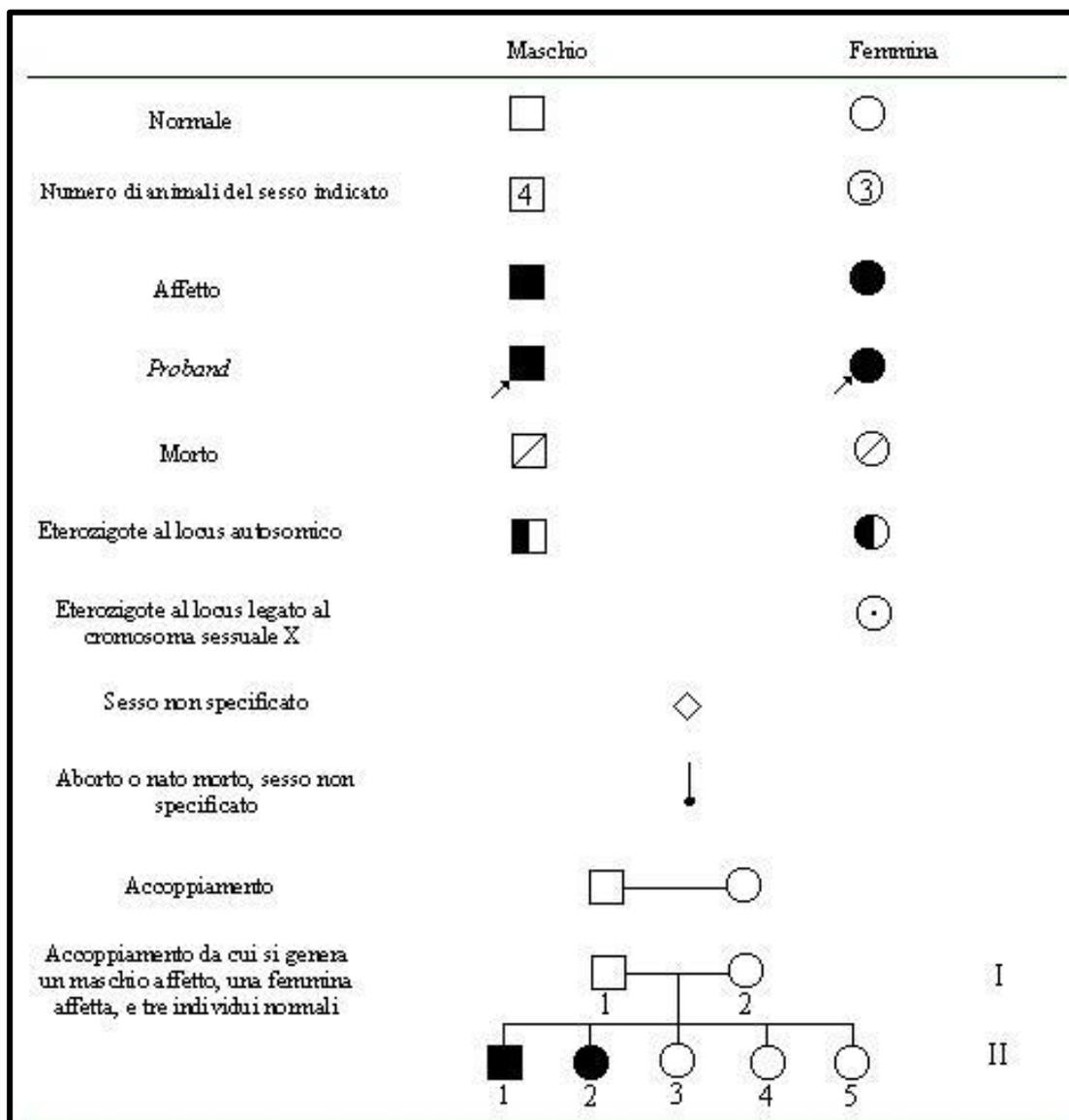


Figura 1 - Simboli usati nel pedigree (Nicholas, 2003a)

1.2.3 Inquadramento Diagnostico e Test Genetici

Dopo la raccolta anamnestica si passa all'esame diretto dell'animale, identificandone i connotati (segnalamento) per passare poi all'esame obiettivo vero e proprio.

L'importanza clinica del segnalamento del soggetto risiede nel concetto noto che vi sono malattie proprie di determinate razze, con predilezione per un determinato sesso, a comparsa in età determinata.

L'osservazione del probando è fondamentale giacché, evidenziando specifiche caratteristiche fisiche immediatamente riconoscibili nel loro insieme, può suggerire una

diagnosi “gestaltica”, cioè una diagnosi “a colpo d’occhio”. Particolare attenzione verrà posta se il soggetto manifesta malformazioni congenite, ritardo di crescita, alterazioni del metabolismo, patologie dell’apparato locomotore o note peculiari.

Si procede quindi con la visita del paziente (esame obiettivo generale e particolare) e se ne descrive accuratamente il fenotipo.

La diagnosi della situazione può essere, in taluni casi, esclusivamente clinica, ovvero basata sulla sola valutazione dell’insieme dei dati derivati dalla anamnesi e dalla semeiotica da parte del “genetista clinico”, in assenza della disponibilità di analisi genetiche per la conferma. In altri casi la diagnosi è raggiungibile tramite l’impiego di *test genetici*. Per test genetico si intende l’analisi a scopo clinico di DNA, RNA, cromosomi, proteine, metaboliti o altri prodotti genici allo scopo di evidenziare genotipi, mutazioni, fenotipi o cariotipi correlati o meno con patologie genetiche.

In medicina veterinaria, e in particolare nella pratica buiatica, non sono disponibili moltissimi test genetici *diagnostici* (o sintomatici), finalizzati cioè alla conferma di una diagnosi clinica o alla caratterizzazione di un quadro patologico sospetto, ma è spesso necessario identificare *ex novo* il gene-malattia, ovvero trovare la correlazione tra genotipo mutato e fenotipo espresso. Questo aspetto richiede lo studio del genotipo, utile nell’identificare alleli o markers associati a una particolare sequenza genetica, evidenziando il polimorfismo di un determinato tratto genomico, cioè la presenza nella popolazione di due o più varianti (alleli, markers) con frequenze significative. In particolare, il genotipo di soggetti malati e quello dei progenitori raccolti all’interno di famiglie, è fondamentale per stabilire la concatenazione dei loci (analisi di linkage) o co-segregazione degli alleli.

Con *analisi di linkage*, s’intende l’identificazione di un aplotipo che, all’interno di un pedigree, accumuna i soggetti sani portatori con quelli malati (Nicholas, 2003b). Un soggetto portatore tramanda alla discendenza un determinato aplotipo e, a seconda del modello mendeliano con cui l’anomalia genica tende a ereditarsi, potrà manifestarsi o meno la malattia.

Se la malattia è autosomica recessiva a penetranza completa, i cromosomi sessuali verranno esclusi dallo studio e i portatori sani avranno lo stesso aplotipo ma con genotipo eterozigote per l’aplotipo associato alla malattia. Viceversa, un soggetto malato

avrà lo stesso aplotipo ma sarà omozigote per quella sequenza allelica associata a malattia. Infine, per determinare se l'associazione osservata è reale, bisogna sottoporre i dati a un controllo statistico parametrico.

Se invece non è possibile determinare il pattern di ereditarietà della malattia, è meglio optare per un'analisi non parametrica. Questo metodo consiste nell'osservare se soggetti affetti tendono a ereditare, all'interno di un pedigree, gli stessi segmenti cromosomici. Concetto chiave è l'identificazione del tratto genomico comune per discendenza (*Identical By Descend* -IBD-, in inglese), cioè di quel segmento cromosomico del padre che è presente in tutti i figli malati ma non in quelli sani.

L'*associazione genica* invece, è un modello non statistico utilizzato quando i soggetti in esame non sono raggruppabili in famiglie, ma sono piuttosto singoli individui appartenenti a una popolazione omogenea. Lo studio di associazione si basa sulla comparazione tra un gruppo di malati e una popolazione di controllo, mirando a individuare la relazione tra alleli che nei malati sono iperespressi e correlati a un determinato tratto genomico all'interno della popolazione. Questa analisi si basa sulla presumibile estrema vicinanza tra l'allele marker e il locus bersaglio. Se i loci sono estremamente concatenati con la mutazione e gli eventi di ricombinazione tra i due loci sono rari, è prevedibile che i soggetti che hanno ereditato lo stesso aplotipo, abbiano ereditato anche la mutazione in esso contenuta. Questa combinazione costituisce un particolare aplotipo ancestrale, diffuso nella popolazione in cui è rilevato, perché trasmesso lungo la discendenza da un comune antenato.

PARTE SECONDA:
ESPERIENZA CLINICA
PERSONALE

Il periodo formativo in Clinica Bovina si è svolto presso il Servizio di Buiatria e piccoli ruminanti del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie (DIMEVET), Università di Bologna. Nel corso dei tre anni di studi, l'attività clinica ha consentito di investigare una variegata pluralità di casi e di ampliare conoscenze e competenze. Ciò ha richiesto dedizione e impegno costante, grazie ai quali è stata avviata la formazione nel campo delle malattie genetiche del bovino. La consapevolezza e la padronanza acquisite hanno permesso una appropriata e corretta gestione dei differenti casi clinici.

Per quanto riguarda le indagini effettuate ai fini della presente tesi si precisa che:

- le indagini cliniche sono state eseguite secondo il metodo indicato dalla scuola bolognese del prof. Albino Messieri;
- le indagini anatomopatologiche sono state svolte, quando possibile, presso il Servizio di Anatomia Patologica del DIMEVET;
- le indagini genetiche sono state condotte dal Dottor Cord Drögemüller e dal Dottor Leonardo Murgiano dell'Institut für Genetik dell'Università di Berna.

Capitolo 2

STUDIO CLINICO E GENETICO DI NUOVE MALATTIE

2.1. La cataratta ereditaria nella razza Romagnola

Con cataratta si intende l'opacamento della lente dell'occhio, il cristallino, che può interessare uno o entrambi gli occhi e comportare una diminuzione della vista finanche alla cecità completa. L'opacamento può essere causato dall'invecchiamento (Petraş, 2013); può presentarsi a seguito di traumi, fenomeni infiammatori, esposizione a radiazioni elettromagnetiche (Hässig et al., 2009) o ultraviolette (Mesa et al., 2013); o essere determinato da deficit nutrizionali e intossicazioni verificatisi durante la gestazione (Chew, 2013; Ate et al., 2011). Più raramente la cataratta ha base genetica.

Nell'opacamento o *edema corneale ereditario* la malformazione è dovuta a un difetto ereditario su base autosomica recessiva semplice, che compare in bovini pezzati neri, Hereford, Aberdeen-Angus, e pezzati rossi polacchi; in una razza di bovini svizzeri invece, la base ereditaria è verosimilmente di tipo autosomico dominante semplice con penetranza variabile. I vitelli colpiti mostrano fin dalla nascita, in modo simmetrico sulla cornea di entrambi gli occhi, un viraggio di questa verso un colore lattiginoso diffuso e una sua protrusione. Questa alterazione si accompagna con un decremento della capacità visiva a lenta progressione; il riflesso pupillare è tuttavia mantenuto al controllo con raggi infrarossi (Stöber, 2004).

La *cataratta congenita* nel bovino compare di norma in forma bilaterale, più raramente monolaterale, e riconosce una base ereditaria autosomica recessiva semplice (Stöber, 2004), oppure è conseguenza di eventi avvenuti durante la gravidanza (infezione intrauterina da Virus della Diarrea Virale Bovina (BVDV). Tale difetto si osserva in bovini di razza Jersey, Hereford, pezzata nera, Braun Swiss e altre (Detlefson et al., 1920; Carter, 1960; Gelatt, 1971): all'esame oftalmoscopico si evidenzia un opacamento del cristallino di forma più o meno stellata o rotondeggiante, ben delimitato, il quale può

diminuire la capacità visiva. Questa malformazione si accompagna talvolta con altre anomalie dell'occhio (opacamento della cornea, distacco della retina, glaucoma), del cervello, della pelle e/o della coda. A differenza della cataratta acquisita dopo la nascita, la cataratta congenita non tende ad aggravarsi (Stöber, 2004).

La razza Romagnola, le cui origini sono datate al IV sec. d.C., era originariamente a duplice attitudine, carne e lavoro. Oggi è selezionata solo per la carne e dal 1996 è ascritta ai libri genealogici delle razze bianche italiane (Chianina, Romagnola, Marchigiana, Maremmana, Podolica), gestiti dall' Associazione Nazionale Allevatori Bovini Italiani Carne (A.N.A.B.I.C).

La popolazione è concentrata nelle province di Forlì, Ravenna, Bologna, Ferrara e Pesaro e, a partire dagli anni '70, la razza è stata introdotta in vari Paesi esteri quali Gran Bretagna, Irlanda, Canada, Stati Uniti, Nuova Zelanda, Australia, Argentina, Messico.

La Romagnola possiede le caratteristiche morfologiche e funzionali di razza specializzata per la produzione di carne che, unitamente all'attitudine dinamica ne garantiscono una grande robustezza, con anteriore ben sviluppato, struttura solida, arti brevi e robusti.

Il piano selettivo è basato sul miglioramento genetico e produttivo del bestiame. I riproduttori vengono selezionati attraverso le prove di performance; la scelta delle femmine avviene sia in base a criteri morfologici e della efficienza riproduttiva, che in funzione dell'attitudine materna. Lo schema di selezione si avvale inoltre di accoppiamenti programmati, dei migliori tori provati sulle migliori vacche indicizzate per la capacità materna, con il più largo ricorso possibile alla fecondazione artificiale e al trapianto embrionale.

2.1.1 Casistica Osservata

Nel Novembre 2013, quattro vitelli di razza Romagnola, di età compresa tra i 3 ed i 4 mesi, sono stati riferiti al Servizio di Buiatria per opacamento oculare bilaterale e disturbo della vista. Uno dei soggetti è stato ricoverato presso il Servizio di Buiatria per un monitoraggio più costante e prolungato nel tempo.

Nell'Aprile 2014, è stato riferito un ulteriore soggetto, maschio, di 2 giorni di età, con i medesimi sintomi. L'animale si trova tuttora in degenza presso il Servizio di Buiatria, con lo scopo di seguire più attentamente l'evoluzione clinica della malattia (Tabella. 1).

Tabella 1- Casistica osservata

N. rif	Sesso	Data di nascita	Data ricovero (R)/ Segnalamento (S)
440/13	Maschio	15.07.2013	04.11.2013 (S)
441/13	Femmina	27.07.2013	04.11.2013 (S)
442/13	Maschio	16.08.2013	04.11.2013 (R)
443/13	Maschio	27.07.2013	04.11.2013 (S)
342/16	Maschio	19.04.2016	19.04.2016 (R)

2.1.2 Quadro Clinico

Un primo esame clinico è stato effettuato direttamente in azienda su tutti e quattro i soggetti. Il proprietario riferiva che il disturbo non era presente alla nascita, ma aveva iniziato a manifestarsi un paio di settimane prima del segnalamento.

I quattro vitelli mostravano opacamento corneale (Figura 2 e 3) con diminuzione della capacità visiva, evidente soprattutto durante la deambulazione forzata.



Figura 2 - Vitello 443/13



Figura 3 – Vitello 442/13

Sviluppo scheletrico e stato di nutrizione discreti, stato mentale nella norma.

Per nessuna delle madri o degli altri capi presenti in azienda venivano riferiti problemi oculari.

L'allevamento di tipo linea vacca-vitello era costituito da 60 fattrici, stabulate libere su paglia nel periodo intercorrente da Novembre a Maggio, e al pascolo per i restanti mesi. L'alimentazione durante il periodo estivo viene integrata con fieno e concentrati, in inverno è invece costituita unicamente da questi ultimi.

La fecondazione è di tipo naturale e i tori vengono sostituiti ogni tre anni per evitare l'eccessiva consanguineità.

Le vacche e le manze vengono annualmente vaccinate per Diarrea Virale Bovina (BVD), Rinotracheite infettiva (IBR), Parainfluenza 3 (PI3) e Virus Respiratorio Sinciziale Bovino (VRSB), utilizzando sempre ceppi inattivati. La profilassi contro i parassiti non viene effettuata di routine ma solo sporadicamente.

Nessuna stazione telefonica si trovava adiacente l'azienda né al momento della visita né in passato.

L'anamnesi ambientale ha permesso quindi di escludere fattori nutrizionali, tossici e fisici tra le cause di cataratta.

L'esame particolare della vista del soggetto ricoverato non aveva rilevato anomalie palpebrali o alla congiuntiva, la risposta alla minaccia era presente ambo i lati, il test lacrimale di Schirmer e la pressione intraoculare risultavano normali. L'esame oftalmoscopico indicava morfologia e composizione fisiologiche dell'iride e un foro pupillare a margini netti. Dopo aver indotto midriasi, l'ispezione di entrambi i cristallini aveva evidenziato un lieve ed irregolare opacamento che si estendeva dal centro alla periferia. La valutazione del fondo non ha riscontrato anomalie alla papilla ottica o al tappeto.

I parametri ematologici e biochimici erano nella norma.

Considerando che la patologia non inficiava la produttività dell'animale, dopo aver condotto tutte le analisi del caso, si è provveduto a dimettere il soggetto.

Il soggetto 342/16 alla prima visita clinica presentava sviluppo scheletrico e stato di nutrizione nella norma, sensorio vigile. La risposta alla minaccia era assente, il riflesso pupillare rallentato ma presente, il palpebrale e corneale nella norma, questo bilateralmente.

Con il passare del tempo l'esame dei riflessi ha dato i medesimi risultati e la risposta alla minaccia non è mai comparsa. La cataratta si è evoluta in una forma matura e l'animale ha sviluppato strabismo convergente (Figura 4), particolarmente pronunciato a livello di occhio destro (Figura 5 e 6), e leggero nistagmo.



Figura 4 – Vitello 342/16

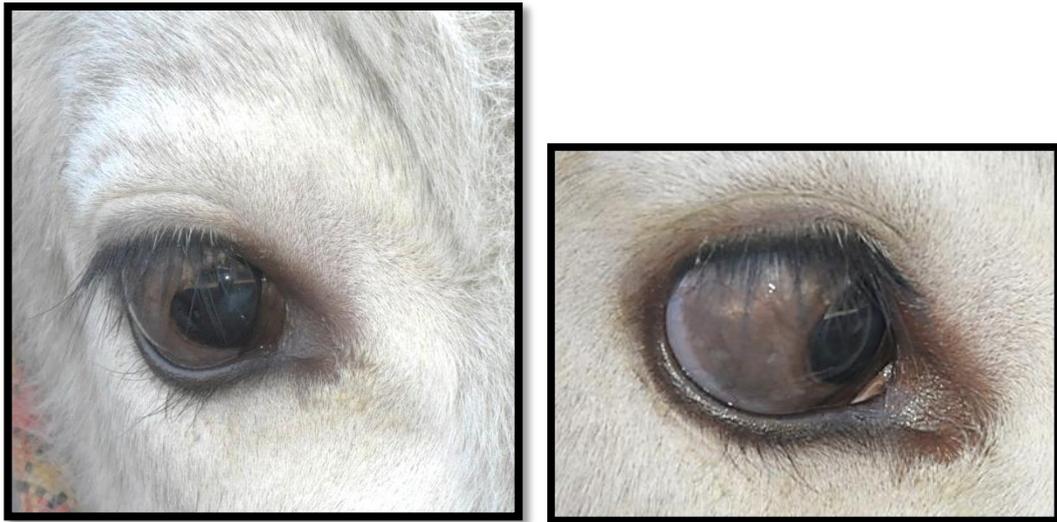


Figura 5 e 6 – Vitello 342/16

2.1.3 Studio Del Pedigree

L'analisi del pedigree (Figura 7) indicava che i quattro vitelli erano fratelli da parte di padre del medesimo toro, Volturmo. Le rispettive madri erano, a loro volta, tutte sorelle da parte di padre di un altro stesso toro, Posimo. Sia Volturmo che Posimo, condividevano un antenato comune, Marte. Purtroppo nessuno dei tre tori era ancora in vita, tuttavia la presenza di una cataratta clinicamente manifesta è probabilmente da escludere in quanto gli animali erano stati selezionati da un centro genetico.

In base ai dati ottenuti dallo studio del pedigree si è ipotizzata una trasmissibilità di tipo autosomico recessivo.

Il pedigree del soggetto 342/16 indicava che il padre era Volturmo e la madre figlia di Posimo, pertanto, rientrava nella genealogia dei primi quattro casi con le medesime connessioni parentali.

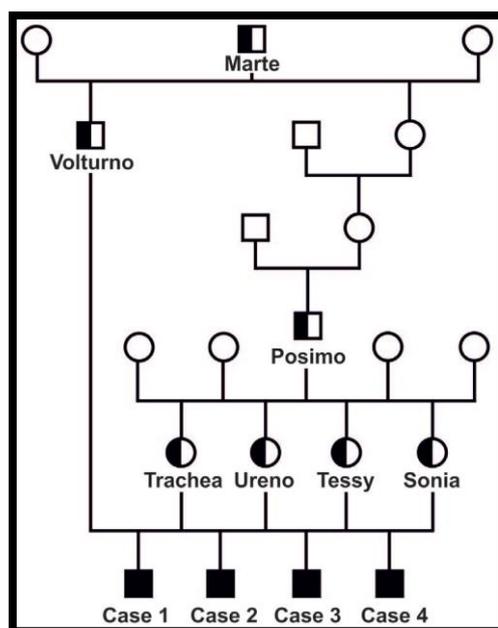


Figura 7- Albero genealogico dei primi quattro casi. I maschi sono rappresentati dai quadrati, le femmine dai cerchi. Gli animali affetti sono rappresentati dal simbolo totalmente nero; gli animali eterozigoti con mezzo simbolo nero; quelli con genotipo ignoto sono rappresentati dal simbolo vuoto.

2.1.4 Studio Del Genotipo

L'analisi genetica ha dimostrato che i cinque vitelli erano tutti omozigoti per la stessa mutazione sul gene Nidogene 1 (NID1); le rispettive madri e i tre tori erano invece eterozigoti. Al fine di stimare la diffusione della mutazione nella popolazione Romagnola, la genotipizzazione è stata estesa a un campione di 1.062 animali sani, dando come risultato una frequenza allelica del 2.4% (Murgiano et al., 2014a).

2.1.5 Considerazioni

Il presente studio descrive il primo caso di cataratta congenita ereditaria del bovino di razza Romagnola. Dimostra inoltre come una strategia appropriata possa condurre all'identificazione genetica del difetto.

Nella razza Romagnola sono note diverse tare a sospetta eziologia genetico / ereditaria. Negli anni allevatori e associazioni di razza hanno riscontrato casi di acondroplasia, idrocefalo, paresi spastica (vedi oltre) e ascite; solo per quest'ultima, la cd. Sindrome del vitello Pancione, è però disponibile un test genetico predittivo (Murgiano et al, 2014b). Questo studio evidenzia come la segnalazione di nuove anomalie, se riportate e studiate, possano portare a nuove conoscenze.

Per altro, in questo studio si identifica nella specie bovina il primo caso di cataratta congenita ereditaria dovuta al gene nidogen 1 (NID1), il quale era stato oggetto di ricerca nei topi ma non nei grossi mammiferi.

Nell'uomo sono note forme di cataratta congenita (Hejmancik, 2008; He et al., 2000; Huang et al., 2010) o giovanile (Churchill, 2011) che compaiono in forma isolata o associate ad altre sindromi, circa un terzo di queste sono dovute a cause genetiche (Shiels et al., 2010). Le cataratte con ereditarietà di tipo mendeliano sono per lo più autosomiche dominanti, più raramente autosomiche recessive o associate al gene X; clinicamente sono molto simili ma possono sottostare a mutazioni di molti geni e di altrettanti loci (Hejtmancik et al., 2010).

La maggior parte degli studi riguardanti la catarattogenesi utilizza come modello animale il topo. Nonostante l'utilità dei modelli animali sia un argomento alquanto controverso, gli studiosi concordano sull'esigenza di impiegare un modello animale di taglia intermedia. Il cane è stato spesso identificato come possibile candidato, sia per la predisposizione di determinate razze alla comparsa di cataratta congenita, sia per le dimensioni dell'organo. Poiché le forme di cataratta umana sono assai eterogenee, una singola specie animale potrebbe non essere rappresentativa per il loro studio: potendo invece disporre di diverse specie animali ciascuna tipologia di cataratta umana potrebbe trovare un modello corrispettivo più confacente alla sua indagine. In veterinaria, così come in umana, le cataratte del bovino vengono trascurate quando invece costituirebbero un eccellente modello per la patologia a lungo termine (Gelatt et al., 1984). Nell'uomo sono note forme di cataratta congenita (Hejmancik, 2008; He et al., 2000; Huang et al., 2010) o giovanile (Churchill, 2011) che compaiono in forma isolata o associate ad altre sindromi, circa un terzo di queste sono dovute a cause genetiche (Shiels et al., 2010). Le cataratte con ereditarietà di tipo mendeliano sono per lo più autosomiche dominanti, più raramente autosomiche recessive o associate al gene X; clinicamente sono molto simili ma possono sottostare a mutazioni di molti geni e di altrettanti loci (Hejtmancik et al., 2010).

2.2 Il nanismo condrodiplastico nella razza Grigio Alpina

In patologia veterinaria, il nanismo disarmonico o *nanismo condro-displastico/distrofico* è notoriamente caratterizzato da una base patogenetica ereditaria. È diffuso a livello mondiale nelle razze da carne, ma si osserva a volte anche in vitelli di razze da latte. Alla base della patologia vi è un disturbo dell'ossificazione encondrale generalizzato o localizzato in determinate regioni scheletriche con prematura saldatura delle linee di accrescimento metafisarie.

Nel *nanismo condrodistrofico a testa corta* (condrodistrofia brachicefala) sono caratteristici la testa corta e larga, il dorso nasale incavato, la fronte prominente, l'esoftalmo, l'accorciamento del mascellare superiore, la protrusione della punta della lingua, il collo compatto, l'addome grosso e gli arti corti (Dirksen, 2004). In caso di malformazioni estreme i vitelli vengono partoriti già morti, oppure non vitali (*condrodiplasia fetale*).

Nei bovini le più frequenti forme di condrodiplasia si riscontrano nelle razze da carne quali Hereford, Aberdeen Angus, Charolais, Shorthorn, Romagnola, ma possono essere colpite anche razze da latte come Jersey, Pezzata nera, e Dexter (Cabassi e Borghetti, 2002).

Nei vitelli Dexter la malattia è trasmessa come carattere dominante incompleto.

Nei vitelli norvegesi di razza Telemark la trasmissione della malattia condrodiplastica avviene tramite un carattere autosomico recessivo.

Nei vitelli di razza Jersey il processo condrodiplastico è trasmesso da un gene autosomico recessivo.

Nei vitelli Hereford si rinviene una particolare forma condrodiplastica (c.d. *nano sbuffante*), secondo alcuni ricercatori legata a turbe del metabolismo mucopolisaccaridico (*mucopolisaccaridiosi di tipo I*) per l'intervento di un carattere autosomico recessivo.

Il *nanismo condrodistrofico a testa lunga* (condrodistrofia dolicocefala) si presenta soprattutto nei vitelli Aberdeen Angus, ma si riscontra anche nelle razze Hereford, Shorthorn e Pezzata Nera. Le dimensioni della testa sono sproporzionate rispetto al resto del corpo: le teste sono più lunghe, senza fronte prominente e senza prognatismo, ma con

un musello affilato; il nanismo è meno pronunciato che nella forma a testa corta (Dirksen, 2004).

Un nanismo acondroplasico a trasmissione autosomica recessiva è stato recentemente identificato anche nella razza Bruna Giapponese, dove la mutazione compare sullo stesso gene ma in una posizione diversa (Takeda et al., 2002).

Per l'accertamento diagnostico sono necessarie analisi genetiche con evidenziazione o esclusione di eventuali portatori del carattere, e indagini relative a possibili carenze o intossicazioni della madre durante la gravidanza.

Vitelli neonati partoriti da madri in grave stato carenziale di manganese, sono piccoli, ipovitali e presentano deformazioni in grado più o meno marcato degli arti: essi appaiono accorciati, e talvolta il carpo e/o il tarso ingrossati risultano deviati in senso mediale; può manifestarsi una riduzione della capacità di movimento delle articolazioni prossimali degli arti, mentre quella delle articolazioni distali (metacarpo- e metatarso-falangee) può essere aumentata in modo abnorme, c.d. "congenital joint laxity" (Ribble et al., 1987).

Cause infettive di deformità scheletrica includono la Diarrea virale bovina (BVDV) e i virus Akabane ed Aino, anche se queste tendono a causare deformità di tipo artrogriposico piuttosto che condrodiplasia.

La *Grigio Alpina / Grauvieh* è una tipica razza bovina di montagna, La popolazione è concentrata soprattutto nelle Province di Bolzano e Trento, soprattutto in contesti marginali ed estremi come quelli dei masi di alta quota; qualche presenza sporadica è registrata in Veneto e Friuli Venezia Giulia

È una razza longeva e di ottima fertilità; gli animali sono di taglia e di peso medio, possiedono un'apparato locomotorio corretto con unghioni particolarmente forti.

Al libro genealogico della razza sono iscritti 16.396 capi (dati statistici al 32.12.2015 (Associazione Nazionale Allevatori Bovini di Razza Grigio Alpina - A.N.A. GRIGIO ALPINA-). Lo schema di selezione per il miglioramento in purezza prevede la creazione delle nuove generazioni di tori scegliendoli tra quelli nati dagli accoppiamenti tra le migliori vacche e i migliori tori, e valutandoli successivamente sia per l'attitudine alla produzione del carne (performance test) sia per quella della produzione del latte (progeny test).

2.2.1 Cenni Di Sviluppo Dell'accrescimento In Lunghezza Del Tessuto Osseo

L'accrescimento in lunghezza di un segmento scheletrico dipende dalla cartilagine di coniugazione. Per tutto il periodo di sviluppo questa continua ad allungarsi per accrescimento interstiziale dal lato rivolto verso l'epifisi, e a essere contemporaneamente sostituita da tessuto osseo dal versante rivolto verso il centro diafisiario. L'ossificazione della cartilagine di coniugazione avviene mediante una sequenza ordinata di stadi facilmente riconoscibili esaminando una sezione longitudinale di osso lungo. Procedendo dal confine con l'epifisi verso la diafisi si riconoscono altrettante zone che corrispondono ai successivi stadi di ossificazione (Siracusa, 2003).

- a) *Zona della cartilagine in riposo* o di riserva. È la zona di cartilagine più vicina all'epifisi ed è formata da cellule cartilaginee, distribuite singolarmente o in gruppi isogeni, e prive di attività proliferativa.
- b) *Zona di proliferazione*. Questa regione assicura il continuo accrescimento in lunghezza del segmento scheletrico. Le cellule cartilaginee al confine con l'epifisi proliferano attivamente disponendosi in gruppi isogeni longitudinali; questo assetto fa sì che la diafisi si accresca in lunghezza assai più rapidamente che in larghezza.
- c) *Zona di ipertrofia* o di maturazione delle cellule e ingrandimento delle lacune. In questa zona la proliferazione si arresta, le cellule si ipertrofizzano e diventano vacuolizzate per poi caricarsi di glicogeno. Le lacune si ampliano notevolmente a spese della matrice interposta. Si mantiene sempre la disposizione delle cellule in colonne longitudinali.
- d) *Zona della cartilagine calcificata* o in regressione. La matrice interposta tra lacune adiacenti si calcifica e va incontro a graduale regressione riducendosi a sottili setti frammisti alle lacune allargate; in vari punti tali setti scompaiono completamente e si formano così ampie cavità longitudinali confluenti. Alla regressione della cartilagine contribuiscono l'azione litica dei condroclasti e quella erosiva dei vasi sanguigni.
- e) *Zona di invasione vascolare e di deposizione di osso*. I condrociti ipertrofici muoiono per apoptosi, probabilmente indotta dall'invasione vascolare. Le cavità longitudinali derivanti dalla confluenza delle lacune cartilaginee lasciate vuote

dalle cellule morte vengono invase da anse capillari e da tessuto mesenchimale. Da questo ultimo si differenziano cellule emopoietiche e osteoblasti che si dispongono alla superficie delle trabecole cartilaginee in regressione e vi depositano uno strato di tessuto osteoide o preosseo; il tessuto osteoide calcifica mano a mano che viene depositato, diventando tessuto osseo.

Nell'adulto, al termine del periodo di accrescimento, l'attività proliferativa dei condrociti del disco epifisario rallenta e poi si arresta, sicché il processo di ossificazione procede fino alla sostituzione completa della cartilagine di coniugazione con tessuto osseo; tale processo è chiamato *chiusura delle epifisi*.

2.2.2. Casistica Osservata

Nel periodo tra Luglio 2013 e Agosto 2014 sono stati segnalati al Servizio di Buiatria un totale di 15 vitelli (Tabella 2) di razza Grigio Alpina, 4 maschi e 3 femmine, di età compresa tra 1 settimana e 4 mesi, per dismorfismo scheletrico con accorciamento di tutti e quattro gli arti manifesto sin dalla nascita.

In tutti i casi i genitori erano di taglia normale.

Cinque degli animali affetti sono stati ricoverati presso il Servizio di Buiatria per un monitoraggio più costante e prolungato nel tempo.

Tabella 2 – Casistica osservata

N. rif.	Sesso	Data di nascita	Data ricovero (R)/ Segnalamento (S)
337/13	Femmina	16.06.2013	31.07.2013 (R)
343/13	Maschio	16.07.2013	26.08.2013 (R)
353/13	Maschio	11.07.2013	09.08.2013(S)
355/13	Maschio	26.05.2013	09.08.2013(S)
361/13	Femmina	15.06.2013	09.08.2013(S)
362/13	Maschio	18.06.2013	09.08.2013(S)
363/13	Maschio	19.08.2013	09.08.2013(S)
426/13	Femmina	05.08.2013	17.10.2013 (R)
427/13	Femmina	05.09.2013	17.10.2013 (R)
539/13	Femmina	21.11.2013	02.12.2013(S)
40/14	Maschio	27.09.2013	19.02.2014 (R)
41/14	Maschio	24.01.2014	19.02.2014 (R)
46/14	Femmina	31.10.2013	22.02.2014 (S)
47/14	Femmina	31.10.2013	22.02.2014 (S)
210/14	Femmina	03.02.2014	20.08.2014(S)

Per tutti gli animali ricoverati e segnalati è stato studiato l'albero genealogico, e sia dagli stessi che dai genitori è stato raccolto materiale biologico (sangue EDTA).

Solo per gli animali ricoverati invece, è stato possibile condurre un accurato esame clinico e indagini post-mortem.

2.2.3 Quadro Clinico

A detta dei proprietari, per tutti i casi, i genitori e gli altri capi presenti in azienda erano normali.

All'esame clinico tutti i soggetti mostravano buone condizioni generali di salute e nutrizione, stato del sensorio vigile e attento, ma anomalo sviluppo scheletrico, caratterizzato da deficienza limitata agli arti con, invece, fisiologico accrescimento delle regioni del tronco e della testa. In particolare, gli arti apparivano sproporzionatamente corti, tozzi con voluminose porzioni epifisarie. Quattro di questi manifestavano difficoltà nell'assumere e/o mantenere la stazione quadrupedale, con un peggioramento progressivo durante la crescita. Gli arti, oltre a essere sproporzionati in lunghezza e volume, apparivano anche variamente ruotati e arcuati (Figura 8 e 9). Questo assetto assiale anomalo era anche accompagnato da lassità legamentosa, da moderata a grave, che impediva agli animali di sorreggersi e deambulare correttamente. La lassità articolare risultava anche chiaramente responsabile dell'andatura oscillante dei vitelli quando questi venivano incoraggiati a camminare. Il maschio 343/13 inoltre, mostrava un profilo caudale più basso (Figura 10), analogo a quello assunto dai vitelli colpiti dalla malattia della jena. Due femmine (426-427/13) mostravano atteggiamento paragonabile a quello dei vitelli affetti da paresi spastica: contrattura del garretto, evidente e palpabile contrazione dei muscoli della coscia sia laterali che caudali, e base della coda sollevata.

Durante la permanenza in clinica le condizioni generali degli animali si sono mantenute buone, con l'aumentare del peso tuttavia la deambulazione è peggiorata fino a costringere gli stessi al decubito sternale praticamente permanente.

Considerato il graduale peggioramento e l'assenza di prospettive di guarigione, gli animali sono stati soppressi in maniera eutanasica e sottoposti a esame necroscopico.



Figura 8 e 9- Vitello 426/13



Figura 10- Torello 343/13

2.2.4 Quadro Anatomoistopatologico

All'autopsia, gli arti apparivano da leggermente a gravemente ruotati e in tutti i casi significativamente ridotti di lunghezza; in particolare la diminuita lunghezza dei segmenti ossei era apprezzabile in omero e femore (Figura 11 e 12). Alla sezione di taglio le cartilagini di accrescimento si mostravano distorte e talvolta irregolari. Radio, ulna, tibia, fibula, ossa metacarpali e metatarsali, falangi, vertebre e coste risultavano normali. Non si osservavano anomalie dello splancnocranio né di mandibola e palato. Non vi erano segni di polidattilia, fratture od osteopenia; mentre in due dei quattro soggetti erano presenti alterazioni cardiache, quali endocardiosi e persistenza del dotto di Botallo.

Da annotare che nei tre soggetti di sesso femminile, nonostante la giovane età, l'apparato riproduttore appariva completamente maturo. L'utero presentava diverse strutture polipoidi endometriali, caratterizzate da un nucleo di collagene edematoso maturo fiancheggiato da epitelio endometriale; le ovaie mostravano la presenza di strutture simil-follicolari sia primordiali che primarie, secondarie e vescicolose; rari invece i corpi lutei.

In uno dei maschi si riscontrava criptoridismo monolaterale.

Gli esiti degli esami istopatologici risultavano simili e hanno rivelato che le cartilagini di accrescimento delle ossa lunghe erano irregolari e prematuramente saldate; i segmenti vertebrali mostravano invece cartilagini di coniugazione grossolanamente organizzate ma normali. La zona di riserva era estremamente ampia, di spessore variabile, a scapito delle zone di proliferazione e di ipertrofia. In queste i condrociti erano disposti in modo irregolare, individualmente o in nidi, con perdita multifocale dell'organizzazione colonnare. Alcuni condrociti contenevano vacuoli citoplasmatici. Le metafisi apparivano di lunghezza ridotta, le trabecole della spongiosa primaria notevolmente accorciate (Benazzi et al., 2014).



Figura 11- Caso 337/13



Figura 12- Caso 41/14

2.2.5 Quadro Immunoistochimico

Le indagini immunoistochimiche sono state effettuate dalla Professoressa Karen Dittmer dell' Institute of Veterinary, Animal and Biomedical Sciences della Massey University in Nuova Zelanda.

I campioni sono stati ottenuti per decalcificazione di tessuto osseo in soluzione EDTA al 10%, provenienti da femore, omero, costa e vertebra di ciascun animale. Il collagene di tipo II era espresso nelle zone di riposo, proliferativa e ipertrofica così come nella spongiosa primaria e secondaria. Il collagene di tipo X era sottoespresso nell'anello pericondrocitico nella zona ipertrofica. La proteina Sonic Hedgehog Homolog (SHH) risultava normalmente espressa nel citoplasma dei condrociti ipertrofici e proliferativi, era invece sovraespressa nella matrice cartilaginea della spongiosa primaria e secondaria. Tali dati suggeriscono una accelerata differenziazione dei condrociti e una prematura ipertrofia degli stessi (Muscatello et al., 2015).

2.2.6 Studio Del Pedigree

Sulla base dei registri genealogici (Figura 13) è emersa una stretta parentela tra nove vitelli, figli di tre tori diversi (Dineg, Dindam, and Dinello), ma tra loro fratelli da parte di padre (Dandy).

La connessione tra gli altri vitelli si trova risalendo ulteriormente nella genealogia di padri e madri, che può essere rincondotta al toro Dalius.

Infine, andando a ritroso fino alla settima generazione, si identifica una antenata comune alla linea genetica sia di Dandy che di Dalius, la vacca Anka, nata nel 1982.

Lo studio del pedigree ha suggerito una possibile ereditarietà del difetto con modalità autosomica recessiva (Murgiano et al., 2014c).

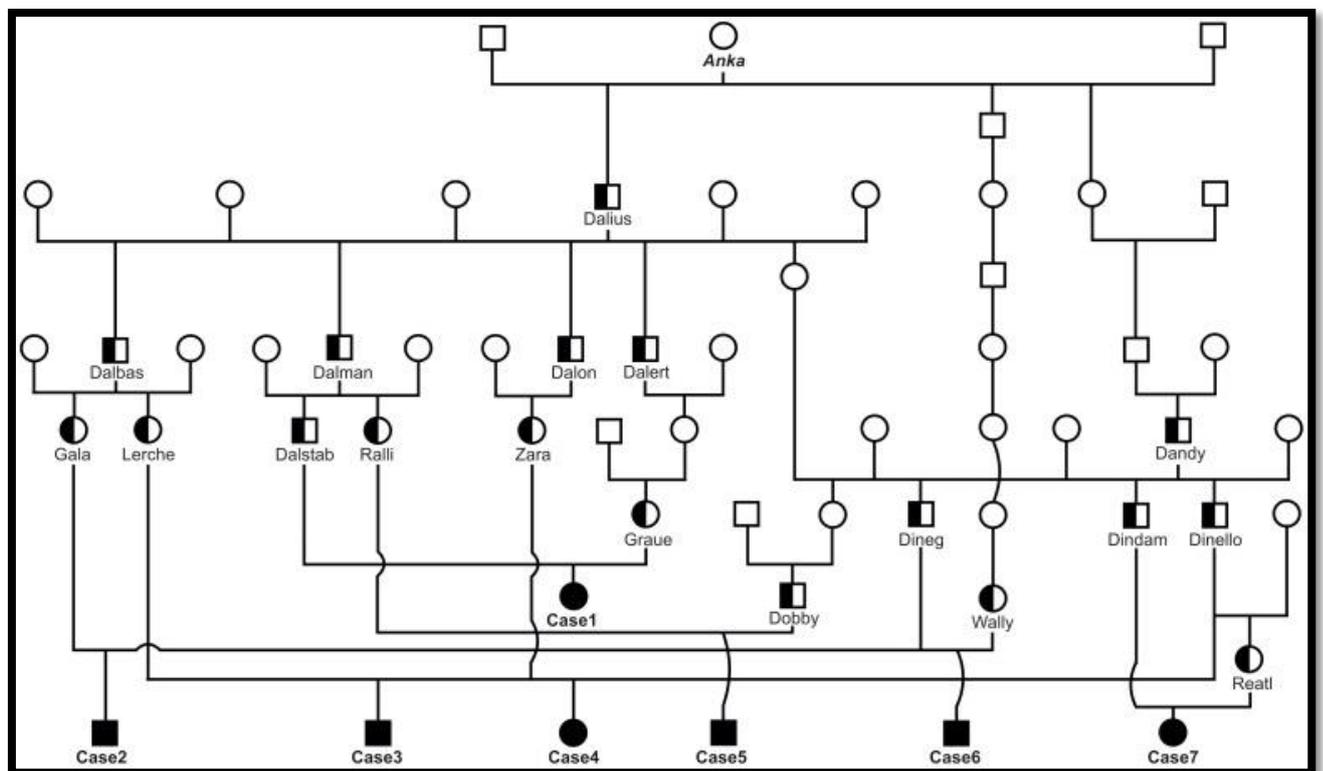


Figura 13- Albero genealogico dei primi sette casi di nanismo condrodisplastico. I maschi sono rappresentati dai quadrati, le femmine dai cerchi. Gli animali affetti sono rappresentati dal simbolo totalmente nero; gli animali eterozigoti con mezzo simbolo nero; quelli con genotipo ignoto sono rappresentati dal simbolo vuoto.

2.2.7 Studio Del Genotipo

È stata effettuata l'analisi genomica su tutti i vitelli malati e su un campione di 44 animali sani di razza Grigio Alpina. Una identica delezione è stata identificata sul gene Ellis-Van Creveld 2 (EVC-2).

Tutti i soggetti affetti sono risultati omozigoti per la mutazione e tutti i relativi genitori eterozigoti. Grazie a campioni biologici raccolti nel corso di altri studi è stato possibile stimare la frequenza allelica deleteria nella popolazione italiana di Grigio Alpina, pari al 15% (Murgiano et al., 2014b).

2.2.8 Considerazioni

Il presente studio evidenzia come la raccolta della casistica di una patologia, anche se nota, ma segnalata ex novo in una determinata razza, e l'elevato potenziale della genetica molecolare possano portare a risultati significativi nella eradicazione di una malattia.

Per altro, nel confronto con la medicina umana la condrodiplosia della Razza Grigio Alpina può costituire un modello di studio per con la cosiddetta Sindrome di Ellis van Creveld.

Nell'uomo, mutazioni dei geni Ellis van Creveld (EVC) ed Ellis van Creveld-2 (EVC2) determinano la sindrome di Ellis van Creveld (forma recessiva) (OMIM 225500) (Galdzicka et al., 2002) e la sindrome di Weyers (forma dominante), nota anche come disostosi acrodentale, (OMIM 193530) che presenta fenotipo simile ma più mite (Ruiz-Perez et al., 2009).

La sindrome di Ellis-Van Creveld è una malattia rara, con circa 150 casi noti a livello mondiale. La prevalenza esatta non è stata stimata, anche se la sindrome sembra essere più comune nella comunità Amish. Dopo la nascita, sono caratteristici la bassa statura, le coste corte, la polidattilia, la displasia delle unghie delle mani e dei denti. In circa il 60% dei casi sono presenti cardiopatie, in particolare difetti del setto atriale. Lo sviluppo motorio-cognitivo è normale. Questa malattia rara viene ereditata come carattere autosomico recessivo, con espressività variabile (ORPHA:289).

2.3 La xantinuria nella razza Grigio Alpina

Le malattie dell'apparato urinario non sono frequenti nel bovino, rappresentano all'incirca solo l'1-3% delle malattie interne. I danni e le alterazioni funzionali dei reni si presentano nella maggior parte dei casi come affezioni secondarie, conseguenti a diverse patologie metaboliche, genetiche e non, o infettive di altri organi. Tutte, prima o poi, esitano nella compromissione di altri settori dell'apparato urinario, o di altri organi e apparati, o addirittura dell'intero organismo (Gründer, 2004).

Tra le rare malattie renali congenito-ereditarie si annoverano ipo- o aplasie di un rene; punteggiature o colorazioni diffuse patologiche, come la lipofuscinosi delle razze Frisone e Rossa Danese (Agerholm et al., 2009), con accertata ereditarietà di tipo autosomico recessivo (OMIA 001407-9913); l'amiloidosi renale congenita (OMIA 000040-9913) (Seifi et al., 1997); la xantinosi renale. Quest'ultima, da sempre ritenuta di origine ereditaria, è basata su un'alterazione del metabolismo delle purine (tesaurismi), conseguente ad una diminuita attività della xantinoossidasi tissutale (fegato, rene, milza), nel corso della quale dei concrementi di xantina si depositano nei tubuli renali e nelle vie urinarie. La malattia si manifesta clinicamente all'età di pochi mesi con diminuzione dell'appetito, deambulazione rigida e lenta, inarcamento del dorso e spossatezza con esito letale. L'urina di questi vitelli ha un pH acido, valori bassi di acido urico ed elevati di xantina; l'urea ematica appare notevolmente aumentata. Alla macellazione la superficie del rene si presenta cosparsa di macchie grigio-biancastre. La superficie di taglio mostra delle striature radiali bianco-grigiastre contenenti cristalli di xantina; il bacinetto renale, gli ureteri, e la vescica contengono calcoli delle dimensioni di una capocchia di spillo (Gründer, 2004).

Nei bovini, casi di calcolosi xanturica e di xantinuria renale sono riportati in giovani bovini di razza Waygu (Hayashi et al., 1979) e nella razza Bionda Galiziana (Miranda et al., 2010). Solo nel 2000, grazie ad Hirano et al., è stata confermata nella razza Nera Giapponese l'eziologia genetica, dovuta, come per l'uomo, a un difetto autosomico recessivo del gene della xantina deidrogenasi (OMIA 001819-9913).

Per dovere di cronaca, bisogna anche ricordare che esiste anche una forma di xantinuria iatrogena, o secondaria, relativamente frequente nei piccoli animali, associata alla somministrazione di allopurinolo nella cura dell'urolitiasi da urati (Osborne et al., 1999).

In medicina umana, la xantinuria ereditaria è dovuta alle mutazioni dei geni della *xantina deidrogenasi (XDH)* o della *sulfurasi del cofattore del molibdeno (MOCOS)*, che provocano la mancata degradazione dell'ipoxantina e della xantina in acido urico, causando l'accumulo di xantina e, in misura minore, di ipoxantina. La xantinuria ereditaria classica comprende la xantinuria tipo I e II: il tipo I è un semplice deficit della xantina deidrogenasi/ossidasi da mutazioni di *XDH*, mentre il tipo II è dovuto al deficit combinato della xantina deidrogenasi e dell'aldeide ossidasi da mutazioni di *MOCOS*. Entrambi i deficit enzimatici esitano nel medesimo fenotipo clinico (Orphanet) e la modalità di ereditarietà è di tipo recessivo.

2.3.1 Casistica Osservata

Nel periodo compreso tra Giugno e Agosto 2016 sono stati segnalati al Servizio di Buiatria, due vitelli, un maschio ed una femmina, di razza Grigio Alpina, aventi età compresa tra i 6 mesi e 1 anno e mezzo (Tabella 2), per appetito capriccioso, mantello arruffato e opaco e in un caso anche onicogrifosi.

I due animali provenivano dallo stesso allevamento, semi-intensivo; erano stabulati su paglia nel periodo invernale, e mantenuti al pascolo durante il resto dell'anno. La fecondazione avveniva in modo artificiale.

A detta del proprietario la madre, la stessa per entrambi i soggetti, era normale, così come i padri e gli altri capi presenti in azienda.

Per tutti gli animali è stato studiato l'albero genealogico, e sia dagli stessi che dai genitori è stato raccolto materiale biologico (sangue EDTA).

Solo per il vitello femmina invece, è stato possibile condurre un accurato esame clinico e indagini post-mortem.

Tabella 2 - Casistica osservata

N. rif.	Sesso	Data di nascita	Data ricovero (R)/ Segnalamento (S)
362/16	Femmina	29.12.2015	15.06.2016 (S)
431/16	Maschio	20.01.2015	08.08.2016 (S)

2.3.2 *Quadro Clinico*

All'esame clinico il soggetto presentava stato del sensorio vigile e attento, sviluppo scheletrico ridotto, discreto stato di nutrizione, difficoltà nell'assunzione della stazione quadrupedale e rigidità nella deambulazione (Figura 14). L'ispezione dei piedi evidenziava la presenza di cerchiature, crescita delle punte verso l'alto e carico sui talloni (Figura 15). Al momento della visita gli unghioni erano stati da poco pareggiati, e il proprietario riferiva che il trattamento era stato ripetuto più volte (2) in quanto la parete cresceva a ritmo particolarmente incalzante.

A fronte di un normale atteggiamento durante la minzione, le urine si presentavano torbide e con renella costituita da concrezioni della grandezza di un chicco di miglio e di colore giallo-brunastro. Il pelo che circondava la vulva non presentava cristalli e la mucosa vulvare appariva normale.



Figura 14- Vitello 362/16



Figura 15- Vitello 362/16

2.3.3 Quadro Ematobiochimico

I parametri ematologici erano nella norma, al contrario quelli biochimici presentavano segni di insufficienza renale, in particolare nel soggetto femmina (Tabella 4).

Tabella 4- Valori biochimici

N. rif	Creatinina 0.9-1.3 mg/dl	Urea 8-23 md/dl	Proteine tot. 6.8-8.6 g/dl	Albumina 3-4.3 g/dl	Calcio 9.7-12.4 mg/dl	Fosforo 5.6-6.5 mg/dl
362/16	5.65	278.94	7.06	3.81	10.40	8.7
431/16	4.21	190.35	6.28	3.46	9.6	5.10

2.3.4 Analisi Degli Uroliti

Gli uroliti erano costituiti da numerose concrezioni a struttura granulosa, superficie ruvida, di colore giallo-brunastro e grandezza variabile (Figura 16), da piccole concrezioni di pochi millimetri a rari uroliti di grosse dimensioni (il più grande di 8x5x3 mm).

L'analisi biochimica degli uroliti è stata condotta presso il Laboratorio di Ricerca sull'urolitiasi, Dipartimento di Medicina, Chirurgia ed Anatomia, dell'Università di Leon, Spagna, ed ha rivelato la presenza di xantina in percentuale pari al 95%.



Figura 16- Caso 362/16

2.3.5 Quadro Anatomopatologico

All'esame macroscopico degli organi i reni apparivano ipotrofici, pallidi e duri, con superficie irregolare. Al taglio il parenchima risultava stridente, la pelvi moderatamente dilatata e contenente concrezioni giallo-brunastre (Figura 17). Gli ureteri si mostravano dimensioni fisiologiche, pervi nonostante la presenza di renella; la vescica non presentava alterazioni macroscopiche della mucosa o della parete, ma conteneva numerosi piccoli uroliti.



Figura 17- Caso 362/16

2.3.6 Studio Del Pedigree

Sulla base dei registri genealogici (Fig.) i due vitelli (*case 3 e case 4* di Fig.) risultavano fratelli da parte di madre. Risalendo le generazioni fino alla settima si è trovato un progenitore comune, un toro nato circa quarant'anni prima.

Fatto curioso, ma al contempo prevedibile in una razza costituita da pochi capi, i due soggetti erano imparentati con altri due vitelli (*case 1 e case 2* di Fig.) di razza Grigio Alpina, gemelli completi, e riferiti al Servizio di Buiatria nel 2010 per una non meglio definita "displasia renale" (Testoni et al., 2012). I quattro casi, quindi, risultavano collegati e infatti tutti e quattro i soggetti condividevano l'antenato comune. In base ai dati ottenuti dallo studio del pedigree si è ipotizzata una trasmissibilità di tipo autosomico recessivo.

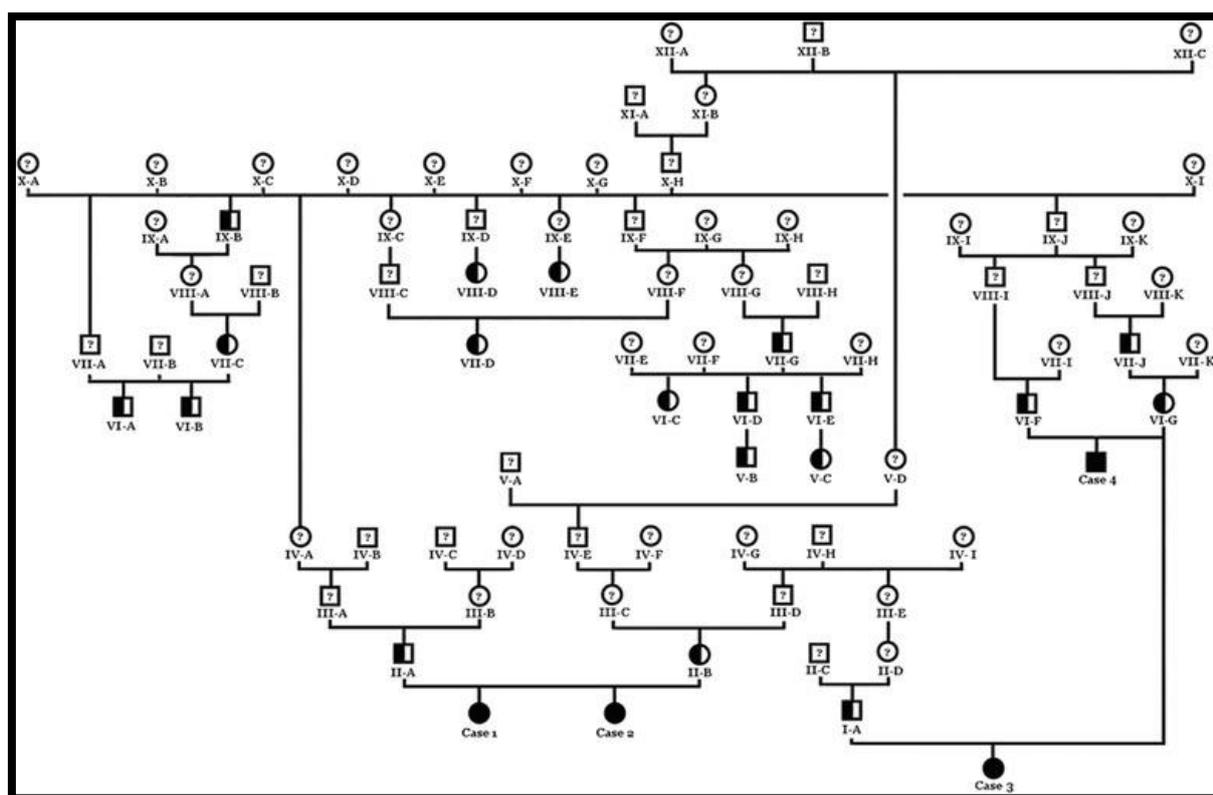


Figura 18- Albero genealogico degli animali con xantinuria. I maschi sono rappresentati dai quadrati, le femmine dai cerchi. Gli animali affetti sono rappresentati dal simbolo totalmente nero; gli animali eterozigoti con mezzo simbolo nero; quelli con genotipo ignoto sono rappresentati dal punto interrogativo.

2.3.7 Studio Del Genotipo

Per identificare l'allele polimorfico è stato genotipizzato il DNA dei due vitelli e della madre, più un campione di 1.201 bovini sani di razza Grigio Alpina. Inoltre, visto il pedigree e la somiglianza fenotipica dei due soggetti citati da Testoni et al. (2012), anche questi due casi sono stati inclusi nello studio. Il sequenziamento genico aveva evidenziato due alterazioni: una mutazione del gene *KIAA2026* e una delezione sul gene del cofattore della sulfurasi del molibdeno (MOCOS). La funzione del gene *KIAA2026* non è ben chiara, sembra però essere coinvolto nella cancerogenesi; d'altra parte, invece, il gene MOCOS è noto per essere implicato nello sviluppo e nella funzionalità renale.

L'analisi genomica aveva dimostrato che solo i due gemelli di Testoni et al. (2012) presentavano omozigosi per la doppia mutazione, mentre i due vitelli (362/16 e 431/16) erano omozigoti per la delezione sul gene MOCOS.

In tutti i casi i genitori sono risultati eterozigoti, quindi portatori sani della delezione.

Da annotare che la genotipizzazione condotta sulla popolazione di razza Grigio Alpina ha evidenziato che 50 dei 1.201 animali analizzati sono carrier per la mutazione e 13 di loro hanno in comune lo stesso antenato dei casi in oggetto (Mutgiano et al., 2016).

2.3.8 Conclusioni

Lo studio condotto ha dimostrato come in popolazioni ristrette, una accurata descrizione clinica del fenotipo e la raccolta di materiale biologico, anche se in un numero relativamente esiguo di soggetti, sia sufficiente ad indentificare il gene difettoso.

Questo lavoro pone inoltre l'attenzione di allevatori e associazioni della razza Grigio Alpina sulla terza tara genetica identificata in pochi anni.

Capitolo 3

SORVEGLIANZA SU MALATTIE A SOSPETTA BASE GENETICA: LE FORME SPASTICHE

La dimostrazione di una anomalia a frequenza familiare o di razza, deve sempre indirizzare il Clinico al sospetto di fattori genetici nella sua eziologia.

Non sempre però è possibile identificare tutti i fattori genetici con geni mendeliani semplici, ricondurli cioè a una ereditarietà indipendente dai fattori ambientali. Nella popolazione bovina si registrano diverse malattie genetiche dipendenti per lo più da un sistema di trasmissione ereditaria poligenica (o polifattoriale). La manifestazione di un carattere patologico determinato poligenicamente si ha soltanto dopo l'accumulazione di geni deleteri e di fattori esogeni delle più svariate categorie. La conseguenza è che la sua espressione non seguirà le leggi di prevedibilità mendeliana, ma si manifesterà in modo irregolare e non prognosticabile.

La possibilità di osservare le caratteristiche fenotipiche degli animali affetti e di raccogliere campioni biologici, rimane la condizione necessaria per dimostrare la partecipazione di fattori genetici all'eziologia di queste malattie.

Nella specie bovina sono note da tempo alterazioni neuro-muscolari spastiche di sospetta natura genetica, quali la Sindrome Spastica e la Paresi Spastica. Non esistendo un test utile all'identificazione degli animali portatori, nel corso dei tre anni di studi è stata implementata per queste malattie una vigilanza particolare.

Gli obiettivi della sorveglianza sono:

- informare e sensibilizzare allevatori e veterinari;
- collezionare la casistica;

- creare una “biobanca” dei soggetti affetti;
- caratterizzare gli aspetti clinico-morfologici e patogenetici;
- studiare il carattere di ereditarietà;
- identificare il difetto genico;
- predisporre un test per il riconoscimento dei soggetti portatori sani (eterozigoti) e stimare la prevalenza (frequenza allelica) all’interno della popolazione bovina.

3.1 Richiami di morfo-fisiologia del sistema neuro-muscolare

Il tessuto muscolare è il parenchima costitutivo di tutti i tipi di muscolo ed è responsabile del movimento volontario ed involontario di organi ed apparati.

Nei vertebrati vi sono tre categorie di muscoli: il *tessuto muscolare striato scheletrico*, che forma i muscoli inseriti sullo scheletro, ed è responsabile del movimento volontario dei segmenti scheletrici e della locomozione; il *tessuto muscolare striato cardiaco*, che costituisce la struttura contrattile miocardica, la cui attività è indipendente dalla volontà; il *tessuto muscolare liscio*, responsabile della motilità della parete dei visceri e dei vasi, la cui contrazione non dipende dalla volontà (Molinaro, 2003).

Il tessuto muscolare striato scheletrico è un tessuto specializzato nella contrazione ed è costituito da elementi muscolari, denominati fibre, di forma allungata che possiedono elettivamente la capacità di contrarsi.

L’elemento costitutivo del muscolo scheletrico viene indicato col nome di fibra. La fibra è una cellula polinucleata che si è formata per la fusione di più cellule chiamate mioblasti. Il citoplasma della fibra è chiamato sarcoplasma ed il nucleo si trova in posizione subsarcolemmale, cioè in periferia; quindi tutta la cellula è occupata dall’apparato contrattile (Vanable e Delmann, 1981).

L’apparato è costituito da proteine contrattili o mioproteine; esse si organizzano in due tipi di filamenti o miofilamenti, diversi per dimensione e composizione chimica: i filamenti spessi ed i filamenti sottili. Entrambi rientrano nella costituzione di particolari strutture della fibra muscolare, le miofibrille.

Le miofibrille sono visibili al microscopio ottico come esili filamenti fra loro paralleli e disposti lungo l'asse longitudinale della fibre; fittamente stipati tra loro, riempiono quasi tutto il sarcoplasma conferendo una delicata striatura longitudinale all'interno della fibra stessa.

Le fibre, esaminate a fresco, presentano una evidente striatura trasversale che forma una successione regolare di segmenti molto rifrangenti e di segmenti meno rifrangenti.

Nei preparati fissati e colorati, i segmenti rifrangenti appaiono intensamente colorati, mentre quelli meno rifrangenti rimangono praticamente incolori.

Se la fibra è esaminata al microscopio a luce polarizzata, le bande rifrangenti scure si dimostrano birifrangenti o anisotrope e perciò appaiono brillanti (banda A), mentre le bande poco colorabili sono isotrope e perciò chiare (banda I).

Ciascuna banda A presenta una zona centrale più chiara e meno brillante, denominata banda H, che appare attraversata nel mezzo da una sottile linea M più scura. Una linea trasversale, la linea Z, divide a metà la banda I. Ciascun elemento di miofibrilla che si estende tra due linee Z successive prende il nome di sarcomero (Molinaro, 2003).

Se si effettua una sezione trasversale della banda A (dove ci sono sia filamenti sottili che filamenti spessi), si può osservare che un filamento spesso è attorniato da sei filamenti sottili e un filamento sottile è attorniato da tre filamenti spessi.

Tutto ciò determina un sistema solidale e di conseguenza, durante la contrazione, tutti i filamenti sono coinvolti simultaneamente.

La membrana sarcolemmatica presenta delle invaginazioni tubulari molto profonde; queste penetrano tra le miofibrille, così da formare una sorta di reticolo tubulare, detto sistema T. Si tratta di tubuli trasversali rispetto all'asse longitudinale della membrana.

Per la funzionalità del muscolo sono di fondamentale importanza i rapporti che il tubulo T contrae con il reticolo sarcoplasmatico. Questo reticolo è extra-miofibrillare e presenta dei tubuli longitudinali riccamente anastomizzati fra loro, che a loro volta formano una sorta di rete attorno ai tratti di miofibrille. Tali tubuli, quando sono a livello di tubulo T, si fondono assieme e danno origine ad una cisterna detta cisterna terminale, che decorre parallelamente al tubulo T (Molinaro, 2003). La struttura costituita da questo e dalle cisterne terminali viene indicata col termine di triade (Figura 19).

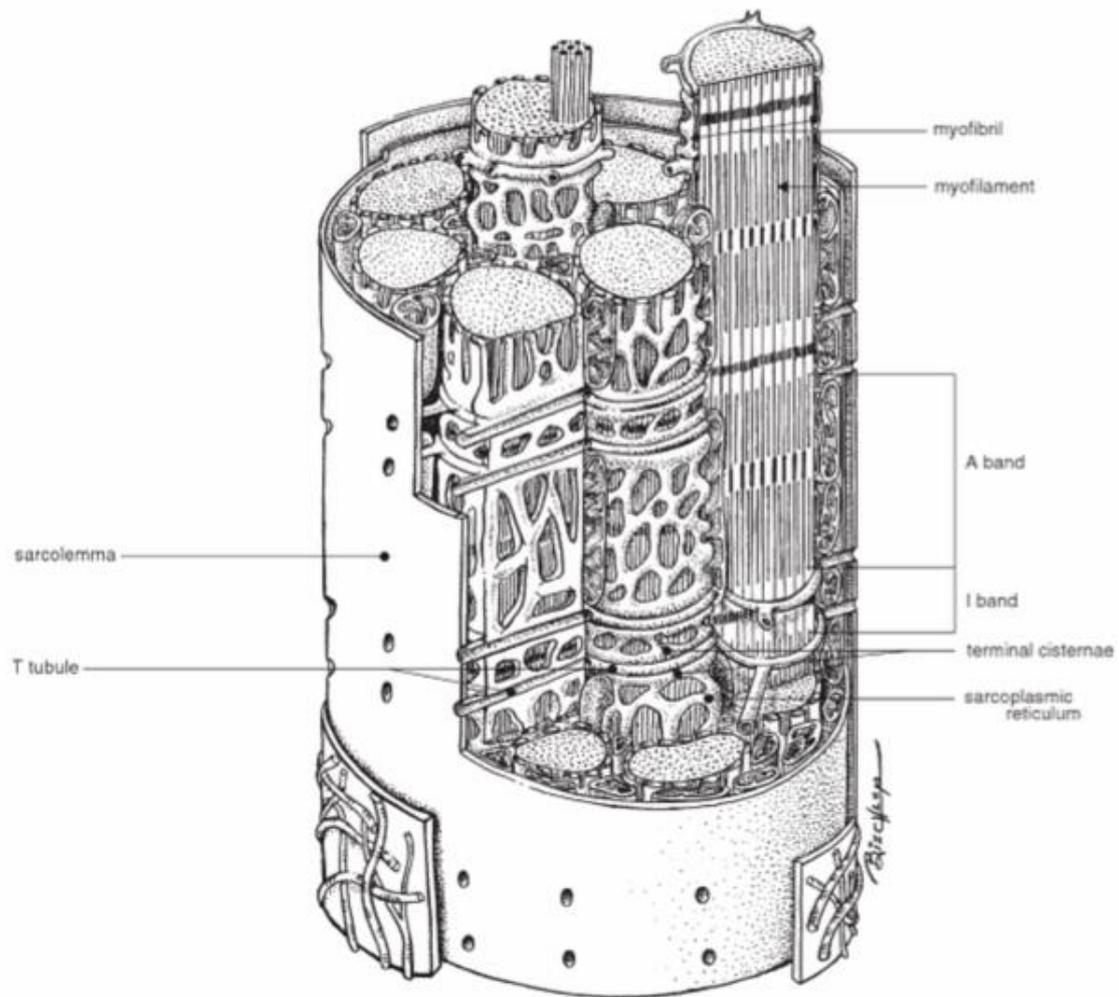


Figura 19 (Eurell, 2000)

Il reticolo sarcoplasmatico in prossimità del tubulo T ha una attività ATP-asica ed in più sequestra il calcio grazie ad una pompa. Al suo interno il calcio è legato, in modo debole, ad una speciale proteina, la calsequestrina, cossichè possa essere rilasciato facilmente. Quando il tubulo T viene percorso dall'onda di depolarizzazione, si ha la liberazione del calcio dal reticolo sarcoplasmatico.

Il filamento spesso è composto da un fascio di molecole di miosina disposte parallelamente tra loro. Le singole molecole sono costituite da una parte globosa (testa), orientata verso l'una o verso l'altra estremità del filamento, e una parte bastoncellare (coda), disposta verso il centro del miofilamento stesso. Lungo la molecola di miosina vi sono due punti di cerniera che, a seguito di interazione acto-miosinica, possono permettere alla testa di flettersi, consentendo così lo scorrimento dei filamenti sottili su quelli spessi.

Il filamento sottile è costituito dalla proteina actina, che è il costituente principale ed in grado di legarsi alla miosina, e da due proteine regolatrici presenti in percentuale minore ovvero la tropomiosina, la troponina (Monesi et al., 1997).

Queste tre classi proteiche presentano tra loro rapporti sterici precisi, che qui di seguito vengono riassunti:

- l'actina è una molecola globulare, formata da due filamenti tra loro avvolti a spirale;
- la tropomiosina è una proteina filamentosa, che si va a inserire nella doccia formata tra i due filamenti di actina;
- la troponina è una proteina globulare che si trova in corrispondenza del punto in cui i filamenti di actina si incrociano ed è formata da 3 subunità:
 - troponina-T (TnT): che ha affinità per la tropomiosina;
 - troponina-C (TnC): a cui si lega il Calcio;
 - troponina-I (TnI): impedisce il legame tra actina e miosina quando la fibra è a riposo (Brazile, 2002).

La zona di contatto tra fibra nervosa e fibra muscolare, attraverso la quale l'impulso passa da un tipo cellulare all'altro, prende il nome di sinapsi neuromuscolare o placca motrice.

La terminazione nervosa si adagia su un infossamento della superficie della fibrocellula. La membrana della fibrocellula a livello di placca è caratterizzata dalla presenza di recettori per l'acetilcolina e da numerose invaginazioni che ne aumentano la superficie; lo spazio giunzionale è, infine, chiuso dalle cellule di Schwann che impediscono la diffusione dell'acetilcolina nello spazio esterno (Molinari, 2003). Il mediatore chimico liberato dal terminale nervoso è l'acetilcolina, la quale si lega al recettore presente sulla membrana muscolare e aumenta la permeabilità al sodio. La positivizzazione che si viene a formare sotto la placca dà origine al potenziale eccitatorio di placca. Il potenziale d'azione determina la liberazione di un secondo messaggero, l'inositolo, che determina l'apertura dei canali per il calcio. Il calcio, come già ricordato, è contenuto nella cisterna terminale del reticolo sarcoplasmatico, legato in maniera debole alla calsequestrina. Esso è quindi lo ione che accoppia l'evento elettrico, sostenuto dal sodio, a quello meccanico.

La troponina presenta tre porzioni: una che si lega all'actina, una che si lega alla tropomiosina e una che si lega al calcio. Quando arriva il calcio, questo si lega alla troponina provocando un indebolimento degli altri legami: la troponina si approfonda nel solco tra le due molecole di actina, trascinando dietro di sé la tropomiosina.

La tropomiosina lascia quindi scoperto il sito di legame per la miosina (filamento spesso), che prima copriva per ingombro sterico.

Nel momento in cui si legano, la testa della miosina subisce una modificazione conformazionale: si piega, chiudendo l'angolo di legame tra la testa e la porzione bastoncellare. Questo determina uno scorrimento dei filamenti actinici su quelli miosinici. A questo punto interviene l'ATP, che risolve il legame acto-miosinico, riportando la miosina alla sua forma originale.

I legami acto-miosinici si formano e si rompono in rapida successione provocando un accorciamento del sarcomero e di conseguenza il fenomeno della contrazione (Camino e Antonietti, 1998).

La resistenza che un muscolo oppone allo stiramento viene definito tono, evento di natura riflessa che ha il suo punto di origine nei propriocettori del muscolo stesso.

Il midollo spinale è la struttura che realizza i riflessi tonici, ma la regolazione del grado di tensione del muscolo dipende, in notevole misura dal controllo esercitato dai centri superiori¹ deputati al controllo dei motoneuroni inferiori.

L'azione tonigena riflessa del midollo spinale e delle strutture centrali è strettamente correlata all'informazione propriocettiva, circa la lunghezza dei muscoli e le forze che essi generano, che nasce nel muscolo con l'eccitazione delle sue strutture sensitive: gli organi muscolo-tendinei del Golgi ed i fusi neuromuscolari. Mentre i primi sono disposti a livello della giunzione fra fibre muscolari e tendine, i fusi neuromuscolari, così denominati per la loro forma, sono situati nella parti carnose dei muscoli e disposti parallelamente all'asse maggiore delle fibre muscolari scheletriche (*fibre extrafusali*) (Kandel et al., 1999). Il fuso contiene un numero variabile di fibre muscolari scheletriche modificate (*fibre intrafusali*), che decorrono parallele alle fibre extrafusali del muscolo in cui è alloggiato. L'intero fuso è delimitato da una capsula connettivale che si estende oltre ciascuna estremità fusale per prendere attacco sulle componenti connettivali del

muscolo. Questo serve ad ancorare il fuso nel suo complesso e, in particolare, le fibre muscolari intrafusali a quelle extrafusali (Bortolami e Callegari, 1999).

Le fibre intrafusali, al pari delle extrafusali, hanno proprietà contrattili, ma limitatamente alle porzioni polari (regione polare), le uniche a possedere una striatura mentre la porzione centrale (regione equatoriale) di queste fibre, invece, è priva di striatura e quindi di capacità contrattile.

Un fuso neuro-muscolare si compone, quindi, di un fascetto di fibre muscolari intrafusali sulle quali termina un gran numero di fibre nervose sensitive e motorie.

Le terminazioni nervose sensitive dei fusi neuro-muscolari vengono distinte in:

- terminazioni anulospirali primarie (Ia): sono le ramificazioni terminali di una singola fibra mielinica afferente di gruppo Ia. Le fibre di gruppo Ia terminano sulla regione equatoriale di tutte le fibre intrafusali (Kandel et al., 1999); una volta raggiunta la capsula del fuso esse perdono la loro guaina mielinica e si spiralizzano attorno a singole fibre muscolari. Le loro ramificazioni più sottili vengono accolte in docce del sarcolemma con il quale stabiliscono rapporti tipo desmosoma;
- terminazioni secondarie (II): sono le ramificazioni terminali di una di una singola fibra afferente mielinica di gruppo II. Le fibre di gruppo II prendono rapporto con fibre intrafusali lateralmente alle terminazioni delle fibre Ia. Anche le terminazioni di queste fibre sono accolte in docce del sarcolemma.

In generale, in ogni fuso c'è una sola terminazione primaria ed una sola terminazione secondaria.

Le fibre muscolari intrafusali ricevono, a livello delle loro regioni polari, una ricca innervazione motoria, costituita da fibre nervose denominate *gamma* e *beta*:

- fibre gamma: derivano dai motoneuroni gamma e terminano mediante placche motrici sulle regioni polari delle fibre muscolari intrafusali determinandone la contrazione (Bortolami e Callegari, 1999);
- fibre beta: sono collaterali di fibre nervose motrici (motoneuroni α) che innervano contemporaneamente fibre muscolari extrafusali ed intrafusali e

hanno il compito di far contrarre le fibre muscolari intrafusali simultaneamente a quelle extrafusali, mantenendo in tal modo il fuso sempre in tensione (Bortolami e Callegari, 1999).

Le fibre extrafusali invece sono innervate dai motoneuroni alfa.

Per l'esecuzione di qualsiasi movimento occorre coordinare l'attività di molti muscoli. Il processo che vincola le azioni di molti muscoli che agiscono assieme, viene detto coordinazione motoria (Kandel et al., 1999). La forma più elementare di coordinazione motoria è costituita dal *riflesso*.

Lo stiramento del muscolo comporta una modificazione in lunghezza delle fibre muscolari intrafusali, con conseguente deformazione delle loro regioni equatoriale e iustaequatoriali, dove risiedono le terminazioni sensitive primarie e secondarie, che, in conseguenza dei loro stretti rapporti con il sarcolemma, vengono deformate e, quindi, stimulate (Bortolami e Callegari, 1999). Questo provoca l'insorgenza di un riflesso monosinaptico, che attraverso la via afferente dorsale penetra nel midollo spinale e contrae rapporto sinaptico diretto con un motoneurone (α -motoneurone) dislocato nella lamina IX delle corna ventrali del midollo spinale. Questo, con il suo neurite, attiva la contrazione delle fibre muscolari extrafusali del muscolo da cui è partito lo stimolo (contrazione riflessa del muscolo).

Si deve notare che la contrazione riflessa di un muscolo in risposta alla scarica fusale può avvenire sia per stiramento del muscolo in toto, che quando le fibre muscolari intrafusali si contraggono a causa dell'attività del motoneurone γ . In questo secondo caso, la contrazione extrafusale si verifica attraverso il cosiddetto *circuito γ* : infatti tale attivazione provoca la contrazione e l'accorciamento delle regioni polari delle fibre intrafusali, che a loro volta stirano da entrambe le estremità la regione centrale eccitando così le fibre sensitive. L'attivazione di queste provoca il riflesso monosinaptico, che si conclude con la contrazione delle fibre muscolari extrafusali e quindi con la contrazione del muscolo (Figura 20).

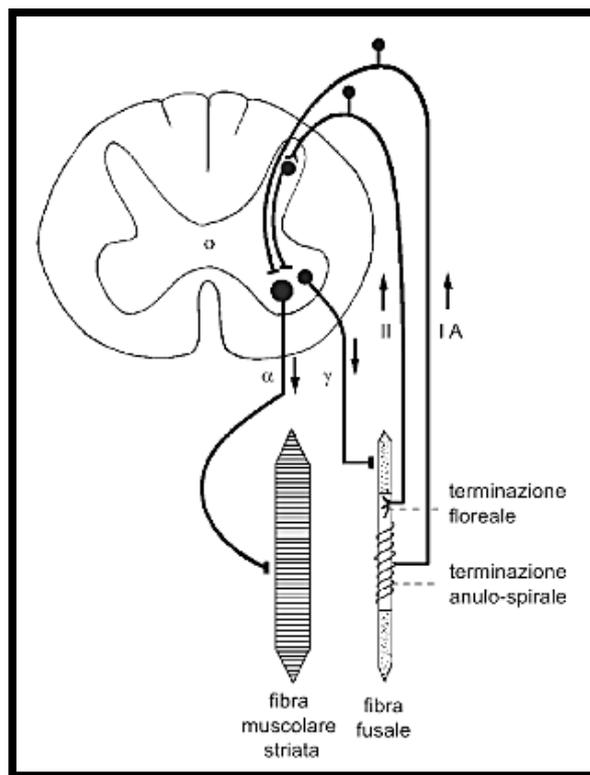


Figura 20 (Pazzaglia, 2008)

Lo stiramento della regione centrale, indotto dai motoneuroni gamma, fa aumentare la frequenza di scarica delle terminazioni sensitive e aumenta anche la sensibilità delle terminazioni sensitive fusali allo stiramento delle fibre intrafusali (Kandel et al., 1999). Questo fa aumentare la sensibilità del fuso neuro-muscolare che può essere subito attivato dopo piccole sollecitazioni (anche di tipo posturale).

Riassumendo il sistema nervoso centrale, provvedendo in modo indipendente all'innervazione del fuso neuro-muscolare mediante i motoneuroni gamma, può regolare la sensibilità del fuso e quindi è in grado di controllare con accuratezza le informazioni che riceve; privilegiando l'informazione dinamica o quella statica al fine di ottenere una corretta estrinsecazione dei movimenti o il mantenimento della posizione (postura) (Bortolami e Callegari, 1999).

3.2 La Sindrome Spastica nella razza Frisona Italiana

La Sindrome Spastica è una patologia neuromuscolare a decorso cronico e progressivo che colpisce i bovini adulti di entrambi i sessi.

La sindrome spastica è nota anche come *paramioclonia* (Dirksen, 2004), *spasmo da stalla* (Rosemberger, 1996), *crampiness* (Dirksen, 2004; Rosemberger, 1996), *crampy* (Scott et al, 2011;), *strecthes* (Dirksen, 2004; Rosemberger., 1996). Colpisce i bovini adulti (Roberts, 1953; Lafortune, 1956) di solito tra i tre e i sette anni di età, di ambo i sessi (Roberts, 1953). È stata riscontrata in tutte le razze, più soventemente nelle Frisone Holstein (Dirksen, 2004; Rosemberger, 1996), nei tori di razza Rossa Danese (Smedegaard, 1964) e nelle Guernsey (Frauchiger et al., 1941; Roberts, 1953; Becker et al., 1961).

3.2.1 Ezio-Patogenesi

L'eziologia e lo sviluppo dell'affezione non sono a tutt'oggi chiariti; verosimilmente non si tratta di una causa unica.

Alcuni Autori hanno suggerito come potenziali fattori patogenetici disturbi del sistema nervoso centrale (Cheli, 1958), anche se ricerche istologiche precedentemente condotte da altri autori non avevano evidenziato alterazioni significative del sistema nervoso centrale (Frauchiger et al., 1941). Un significato eziologico è stato inoltre attribuito a: processi cronico deformanti a livello di colonna lombare, (Lafortune, 1956; Rosemberger, 1996); alterata regolazione dei riflessi posturali (Roberts, 1965; Famigli Bergamini et al., 1995); cause muscolari (Arita, 1988; Tenzsen, 1998) e possibili squilibri nutrizionali (Roberts 1965). Di fatto però nessuna ipotesi è stata confermata.

Tutti gli autori concordano sulla esistenza di una predisposizione genetica per questa malattia (Dirksen, 2004). La modalità con cui la patologia viene trasmessa tuttavia non è chiara. Secondo alcuni autori la causa dell'affezione andrebbe ricollegata a un gene autosomico recessivo a penetranza incompleta (Becker et al., 1961; Roberts, 1965), mentre altri ipotizzano che la sindrome spastica sia riferibile a un gene autosomico dominante a penetranza incompleta (Sponenberg et al., 1985). La malattia, inoltre, potrebbe anche essere determinata da più geni (Becker et al., 1961).

3.2.2 *Quadro Dismorfico*

L'esordio della patologia passa di solito inosservato.

La manifestazione clinica si evidenzia nel momento in cui l'animale si alza (Becker et al., 1961) e distende uno o entrambi gli arti posteriori a scatto per qualche secondo.

A volte la sintomatologia può coinvolgere inizialmente solo uno dei due arti posteriori e successivamente divenire bilaterale (Dirksen, 2004; Rosemberger, 1996).

Quando gli spasmi muscolari interessano un solo arto, il movimento effettuato ricorda quello tipico del cavallo che soffre di crampi agli arti (Lafortune, 1956). Se invece la patologia colpisce entrambi gli arti, l'animale assume, durante gli episodi, un atteggiamento particolare caratterizzato dall'estensione caudale degli arti posteriori associata a iperestensione del garretto. Contemporaneamente il soggetto acquisisce una posizione di cifosi e tutto il peso viene portato sul bipede anteriore (Dirksen, 2004; Rosemberger, 1996). Sentendosi sbilanciato in avanti, l'animale punta i piedi degli arti anteriori contro il pavimento, la mangiatoia, o il muro, assumendo una postura in cui è "fuori di sé", sia con gli arti anteriori che con i posteriori. In alcuni casi l'arto posteriore maggiormente interessato è mantenuto sollevato e tremante (Dirksen, 2004; Rosemberger, 1996).

Peculiare è il fatto che i sintomi non sono presenti quando l'animale è in decubito, ma si manifestano solamente quando il soggetto si trova in stazione quadrupedale.

Tra un episodio e l'altro gli animali appaiono completamente normali, sia per quanto riguarda il mantenimento della postura in stazione, sia per quanto concerne l'andatura. Se invece l'animale viene forzato a camminare durante la manifestazione della sintomatologia, i movimenti risultano rigidi e gli arti posteriori divaricati. Analogamente, se la sintomatologia compare mentre l'animale sta deambulando spontaneamente, il soggetto si arresta oppure continua a camminare con passi brevi e arti posteriori divaricati. (Dirksen, 2004; Rosemberger, 1996).

L'intensità e la durata degli spasmi muscolari aumentano col passare del tempo (Dirksen, 2004; Rosemberger, 1996); possono protrarsi anche per 30 minuti (Roberts, 1953).

Lo stato del sensorio rimane inalterato anche durante la comparsa degli episodi di spasmi muscolari (Dirksen, 2004; Rosemberger, 1996); la propriocezione risulta nella norma (Bradford, 2009).

La classificazione sintomatologica proposta da Cheli (1988) suddivide la malattia in tre stati a seconda della gravità.

Nella forma lieve di sindrome spastica la comparsa della sintomatologia si verifica in maniera improvvisa senza la presenza di altri segni clinicamente rilevabili.

Gli animali affetti mostrano contrazioni muscolari della durata di 8-10 secondi che coinvolgono la muscolatura degli arti posteriori, con spostamento indietro degli stessi.

Tali spasmi muscolari compaiono solamente quando l'animale passa dal decubito alla stazione e possono ripresentarsi una o due volte, a distanza di pochi secondi da quando è avvenuto il cambiamento di posizione.

Alcuni soggetti rimangono in questa condizione per qualche anno senza evidenti variazioni dei sintomi, mentre in altri animali tale stato perdura 1-2 mesi per poi peggiorare ed evolvere nelle forme successive.

La forma grave di sindrome spastica si può manifestare dopo la comparsa della forma lieve come sua progressione, oppure improvvisamente (soprattutto dopo il parto) non preceduta da forme prodromiche.

Le contrazioni spastiche appaiono nel momento in cui l'animale si alza assumendo la stazione, sono violente e portano allo spostamento caudale del bipede posteriore e hanno una durata di 10-30 secondi. Diversamente dalla forma lieve, quando il soggetto affetto dalla patologia tenta di riportare gli arti posteriori in posizione normale, gli spasmi tonico-clonici ricompaiono con la stessa intensità e la medesima durata. Quanto riportato si ripete 4-5 volte dopo che l'animale ha assunto la stazione.

Tra un episodio e l'altro la deambulazione si presenta normale anche se si evidenzia una certa rigidità del bipede posteriore (Cheli, 1988).

La durata della sintomatologia tipica della forma grave è variabile, in alcuni soggetti dura molti anni, in altri invece i sintomi peggiorano e si raggiunge lo stadio successivo.

La forma gravissima di sindrome spastica è sempre preceduta dalla forma grave. A questo stadio i soggetti affetti dalla patologia rimangono quasi sempre in decubito e assumono la stazione quadrupedale solo se stimolati.

Dopo che l'animale si è alzato si ha la comparsa di contrazioni spastiche violente che possono estendersi anche al tronco e raggiungere il collo. I crampi hanno una durata di

qualche minuto. Successivamente sono sufficienti anche solo piccolissimi movimenti affinché tali spasmi ricompaiano con le medesime caratteristiche.

Gli attacchi spastici possono, in alcuni soggetti, essere così ravvicinati da diventare continui, portando a una deambulazione caratteristica in cui gli arti posteriori, che sono molto contratti, appoggiano in punta e l'animale procede a scatti.

3.2.3 Diagnosi Differenziale

La diagnosi di sindrome spastica si effettua sulla base della sintomatologia clinica caratteristica (Dirksen, 2004) e in seguito all'esclusione delle altre possibili cause che devono essere prese in considerazione in diagnosi differenziale (Rosemberger, 1996; Scott et al., 2011).

Contrazioni simili a quelle che si osservano negli animali affetti da sindrome spastica si possono presentare anche in animali colpiti da ulcera soleare di Rusterholz (Rosemberger, 1996). In quest'ultimo caso il soggetto malato mostra zoppia evidente in appoggio. L'animale in stazione è irrequieto e manifesta fibrillazioni muscolari. Nelle forme più gravi può sollevare l'arto dolente anche ripetutamente. Se dopo trattamento della patologia podale gli spasmi muscolari scompaiono, tale sintomatologia non può essere riferita a una condizione di S.S.: di fatto la conferma della diagnosi di sindrome spastica è data dal successo o meno del trattamento della pododermatite (Rosemberger, 1996).

La sindrome spastica va distinta inoltre dalla Paresi Spastica (si veda oltre). Le differenze primarie consistono nel segnalamento: la sindrome spastica colpisce solo bovini adulti, mentre nella paresi spastica possono essere affetti anche i vitelli (forma precoce della patologia).

Inoltre nella sindrome spastica sono presenti contrazioni tonico-cloniche, cioè intermittenti, della muscolatura, diversamente da quanto accade nella paresi spastica in cui si manifesta uno stato spastico che per definizione è permanente.

In ultimo le due patologie si differenziano anche sulla base della localizzazione: la contrazione muscolare tipica della paresi spastica rimane confinata ai muscoli gastrocnemio e flessore superficiale delle dita (eventualmente anche ai muscoli della coscia) ma non si estende mai ad altre regioni, diversamente da quanto accade nella

sindrome spastica in cui col progredire nella malattia le contrazioni possono coinvolgere anche la muscolatura di tronco, collo e arti anteriori.

Un'altra malattia da considerare prima di emettere diagnosi di sindrome spastica è la spondilosi/spondilartrosi deformante cronica dei tori da riproduzione che consiste nella progressiva ossificazione di corpi, articolazioni e processi spinosi vertebrali nel punto di passaggio tra il tratto toracico e quello lombare. I tori colpiti presentano riluttanza al movimento e alla monta, mancano però le contrazioni tipiche della sindrome spastica.

È necessario anche escludere l'ostecondrosi dei torelli da carne, le forme reumatiche e la poliartrite. Le suddette patologie sono accomunate da andatura rigida o incerta e decubito frequente, in tutti i casi mancano però i caratteristici spasmi spastici (Dirksen, 2004).

Incoordinazione e spasmi muscolari si verificano anche nelle compressioni del midollo spinale, ma i sintomi sono costantemente presenti e hanno progressione rapida (Câmara et al., 2008).

Infine è necessario escludere tutti quei processi morbosi sistemici che determinano spasmi come il tetano, in cui la differenziazione è suggerita da anamnesi e concomitanza di segni patognomonic (Cheli, 1958; Dirksen, 2004); la tetania ipomagnesiemica, in cui la somministrazione per via endovenosa di sali di calcio e di magnesio determina la scomparsa dei sintomi (Câmara et al., 2008); e l'epilessia, a cui però è associato un sensorio completamente assente durante le contrazioni (Cheli, 1958).

3.2.4 Prognosi E Approccio Terapeutico

La prognosi di sindrome spastica rimane sempre riservata od infausta (Dirksen, 2004; Rosemberger, 1996) essendo la suddetta patologia a carattere cronico progressivo, seppure diversi Autori riportino casi di attacchi spastici remittenti (Roberts, 1953) e intermittenti (Dirksen, 2004; Rosemberger, 1996) nell'arco della vita dell'animale affetto. ,

I soggetti colpiti possono essere utilizzati per diversi anni (Roberts, 1953), anche se negli stadi più avanzati della malattia la produzione lattea è compromessa (Dirksen, 2004; Rosemberger, 1996) e l'attività ovarica può cessare (Becker, 1968); inoltre, durante gli

attacchi, gli animali possono ferirsi gravemente (Roberts, 1953) rendendone necessario l'abbattimento.

L'assunzione di alimento e lo stato di nutrizione risultano inficiati solamente negli stadi avanzati. Il motivo principale è che gli animali colpiti, soprattutto nella forma grave, trascorrono molto tempo in decubito e si alzano meno frequentemente (Dirksen, 2004; Rosemberger, 1996).

Una terapia risolutiva per la spasticità non è ad oggi conosciuta. A scopo palliativo si può prendere in considerazione l'impiego di antinfiammatori non steroidei (Andrews *et al.*, 2004; Dirksen, 2004; Preiss, 1967; Rosemberger, 1996) e miorilassanti (Dirksen, 2004). In letteratura sono riportati pareri discordanti riguardo l'effettivo miglioramento indotto dalla somministrazione di vitamine e sali minerali (Roberts, 1953; Rosemberger, 1996; Dirksen, 2004).

In tutti i casi è sempre raccomandabile garantire il comfort degli animali affetti da sindrome spastica e prevenire la comparsa della sintomatologia in forma grave. Sarebbe utile predisporre box con abbondante paglia e pavimento non scivoloso (Roberts, 1965); i piedi andrebbero esaminati e pareggiati con regolarità al fine di prevenire pododermatiti o stress a carico di articolazioni e legamenti; la dieta dovrebbe essere bilanciata e basata su alimenti facilmente digeribili. Fintanto che i segni clinici sono lievi è consigliato un esercizio giornaliero moderato.

Dal momento che si sospetta fortemente una base genetica, l'unica soluzione proponibile è escludere dalla riproduzione sia i soggetti affetti (Rosemberger, 1996) che la loro progenie (Scott *et al.*, 2011).

3.2.5 Casistica Osservata

A fronte delle numerose segnalazioni di sindrome spastica ricevute nell'anno 2015 si è ritenuto necessario aggiornare lo stato dell'arte. Sono stati considerati quindi tutti i casi (Tabella 5) diagnosticati dal Servizio di Buiatria nel periodo di tempo compreso tra il 1994 e il 2015, per un totale di 55 soggetti. Per 31 di questi, le valutazioni sono state condotte in maniera retrospettiva avvalendosi delle cartelle cliniche depositate presso il Servizio di Buiatria e di materiale video e fotografico.

Tabella 5 - Casistica osservata

Numero progressivo bovini	Sangue EDTA stoccato	Foto o Video	Biopsia muscolare	emogas	Genealogia	Emocromo	Biochimico
a	no	no	no	no	si	si	si
b	no	no	no	no	si	si	si
c	no	no	no	no	no	si	si
d	no	no	no	no	no	si	si
e	no	no	no	no	si	si	si
f	no	no	no	no	si	si	si
g	no	no	no	no	si	no	no
h	no	no	no	no	si	no	no
i	no	no	no	no	si	no	no
l	no	no	no	no	si	no	no
104/2004	si	si	stoccaggio materiale vario	si	si	no	si
115/2004	no	si	colonna congelata	no	si	no	no
34/2006	no	no	no	no	si	si	si
35/2006	no	no	no	no	si	no	no
43/2008	no	si	no	si	si	no	no
44/2008	no	si	no	si	si	no	no
45/2008	no	si	no	si	si	no	no
46/2008	no	si	si	si	si	no	no
47/2008	no	si	no	si	si	no	no
157/2008	si	no	no	si	si	no	no
159/2008	no	no	no	si	si	no	no
187/2008	si	no	no	no	si	no	si
204/2008	si	no	no	no	si	no	si
205/2008	si	si	no	no	si	no	si
206/2008	si	si	no	no	si	no	si
207/2008	si	si	no	no	si	no	si
227/2008	si	si	no	no	si	no	si
228/2008	si	si	no	no	no	no	si
231/2009	si	si	no	no	no	no	si
232/2009	si	no	no	no	no	no	si
255/2009	si	si	no	no	no	no	no
156/2010	si	si	no	no	si	no	no
157/2010	si	no	no	no	si	no	no
158/2010	si	si	no	no	si	no	no
485/2010	no	si	no	no	si	no	no
486/2010	no	no	no	no	si	no	no
260/2011	si	si	no	no	si	no	no
261/2011	si	si	no	no	no	no	no
265/2011	si	si	no	no	no	no	no
266/2011	si	no	no	no	no	no	no
280/2011	si	si	no	no	si	no	no
76/2015	no	si	si	si	si	si	si
77/2015	no	si	si	si	si	si	si
86/2015	no	si	no	si	no	si	si
87/2015	no	si	no	si	si	si	si
173/2015	no	si	no	no	si	no	no
174/2015	si	si	no	si	si	si	si
175/2015	no	si	no	no	si	no	no
176/2015	si	si	no	si	si	si	si
177/2015	no	si	no	no	si	no	no
178/2015	si	si	no	si	si	si	si
350/2015	si	si	no	si	no	si	si
352/2015	si	si	no	si	si	si	si
353/2015	si	si	no	si	si	si	si
354/2015	si	si	no	si	si	si	si

3.2.6 Quadro Clinico

Gli animali con sindrome spastica, fatto salvo per una vacca di razza Romagnola, erano tutti di razza Frisona e provenienti dalla zona del modenese. Avevano una età compresa tra i 2 e i 9 anni e suddivisi in 26 femmine e 29 maschi.

Tutti presentavano una contrattura crampiforme a carico degli arti posteriori che in molti casi obbligava l'animale a incurvare il dorso e a spostare il peso in avanti. Tale sintomatologia non è mai stata osservata quando gli animali si trovavano in decubito.

In tutti i 55 bovini affetti da sindrome spastica lo sviluppo scheletrico è stato considerato nella norma; in 3 è stata evidenziata un'iperestensione bilaterale dei garretti.

La tonicità muscolare alla palpazione dei muscoli di coscia, groppa e schiena in condizioni di riposo, era da considerarsi fisiologica in 48 animali su 55.

L'andatura si presentava rigida e impacciata quando i pazienti venivano spinti a camminare durante gli accessi contratturali. Inoltre in molti soggetti si poteva notare anche un atteggiamento caratteristico con sollevamento ed estensione latero-caudale di uno dei due arti posteriori o di entrambi in maniera alternata.

L'esame neurologico di tutti i 55 bovini è risultato nella norma.

L'esame ortopedico ha evidenziato diversi casi di ectasie sinoviali di alcune articolazioni, piedi mal curati a ciabatta, e malattia della linea bianca in soli due soggetti.

È stato possibile osservare il comportamento al momento del salto soltanto in 4 casi: è risultato nella norma in 3 tori; in uno invece sono comparsi i caratteristici crampi subito dopo la fine dell'accoppiamento.

Gli animali infine, in base alla severità della sintomatologia presentata, sono stati suddivisi in tre gruppi (Tabella 6), ovvero nelle forme cliniche suggerite da Cheli (1958): lieve, grave (Figura 21) e gravissima (Figura 22).

Tabella 6 - Distribuzione degli animali in base alla forma clinica

FORMA CLINICA	N. ANIMALI	% SUL TOTALE (55)
Forma lieve	39	71%
Forma grave	13	24%
Forma gravissima	3	5%



Figura 21- Vacca 175/15



Figura 22- Vacca 176/15

3.2.7 Quadro Ematobiochimico Ed Emogasanalitico

Di 28 soggetti è stato valutato il profilo emato-biochimico, di 19 quello emogasanalitico.

I risultati sono riportati in Tabella 7.

Tabella 7

ENZIMA	RANGE	AUMENTATO	DIMINUITO	NORMALI
AST	43-127 IU/L			28/28
LDH	697-1445 IU/L	17		11/28
CK	105-409 IU/L	15		13/28
CREATININA	0.9-1.3 mg/dl	4	14	4/22
UREA	8-23 mg/dl	12		10/22
LATTATO	0.56-2.2 mmol/L	3	2	14/19
CALCIO totale	9.7-12.4 mg/dl		19 (3* < 8mg/dl)	9/28
CALCIO ionizzato	3.19-5.25 mg/dl		2	12/14
FORSFORO	5.6-6.5 mg/dl	1	21 (2* < 1.5 mg/dl)	6/28
MAGNESIO	1.8-2.3 mg/dl	12	3 (1* < 1.5 mg/dl)	7/22
SODIO	132-152 mEq/L	3	1	18/22
POTASSIO	3.9-5.8 mEq/L		3	19/22
COLORO	97-111 mEq/L		8	14/22

* N° casi con valori sono al di sotto del "concern level" individuato dalla PennState Extension – Penn State College of Agricultural Sciences.

Le concentrazioni degli enzimi aspartato transaminasi (AST) e creatin chinasi (CK) non sono risultate aumentate rispetto al range di riferimento, pertanto non indicavano un danno muscolare. I valori della lattato deidrogenasi (LDH) erano più elevati nel 60% dei soggetti. Tale dato, considerata la sua scarsa specificità e i valori normali degli altri due enzimi muscolari sopracitati, non può essere considerato indicativo di danno muscolare. In più della metà degli animali un calo della CK e della creatinemia potrebbe essere giustificato dalla riduzione della massa muscolare (Rosalki, 1998).

I valori del lattato risultano aumentati rispetto al range di riferimento nel 16% dei casi, probabilmente a causa di un incremento del consumo energetico necessario per la contrazione muscolare.

La valutazione del profilo elettrolitico non ha messo in evidenza alcuna alterazione imputabile alla sindrome spastica.

3.2.8 Studio Del Pedigree

Sono stati analizzati i pedigree dei 27 tori e delle 17 vacche e si è ricostruito l'albero genealogico fino alla terza generazione. I dati sono stati incrociati in modo da individuare quali fossero i soggetti che davano prole malata e quali fossero i nomi più ricorrenti nella genealogia.

Solo in un caso è stata riscontrata una correlazione di prima generazione, ovvero di un toro malato che ha generato due figlie malate.

I nomi dei tori che più frequentemente compaiono in prima, seconda o terza generazione sono 4; peraltro, nella genealogia di sette dei nostri casi (6 tori ed 1 vacca), 2 di questi risultavano contemporaneamente presenti.

Infine le genealogie di tutti i soggetti con sindrome spastica sono state riunite per evidenziare le parentele che sussistono tra questi. Si è così potuto risalire a un unico antenato comune (Figura 23).

Tuttavia va sottolineato che un limite importante nello studio del pedigree è rappresentato dalla variabilità dell'età di comparsa della malattia, pertanto numerosi casi potrebbero essere sfuggiti alle statistiche poiché macellati prima della manifestazione della stessa. Questo vale in particolare per le vacche, la cui carriera produttiva è spesso inferiore al range temporale di comparsa della patologia, e per tutti i soggetti maschi non

destinati alla riproduzione la cui macellazione avviene ovviamente prima dei 3 anni di età.

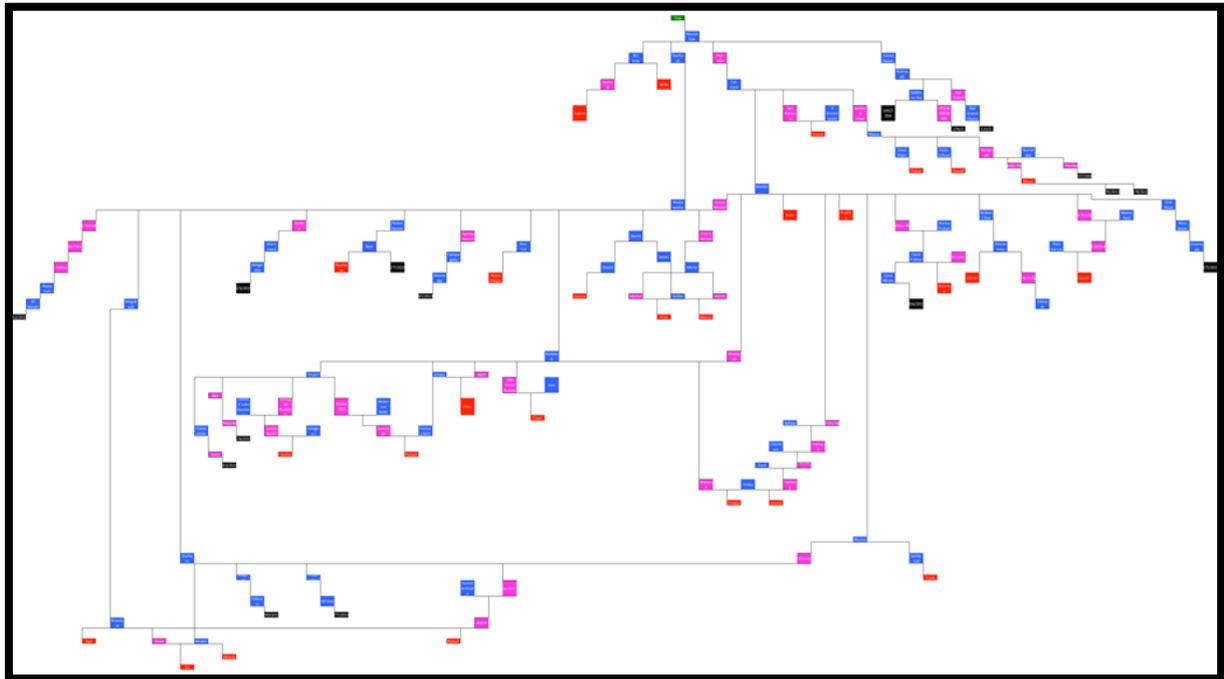


Figura 23- Albero genealogico dei soggetti affetti. I diversi colori indicano: in rosso i tori affetti, in nero le vacche affette; in azzurro maschi e in rosa femmine con fenotipo ignoto; in verde l'antenato comune.

3.2.9 Studio Del Genotipo

L'analisi genetica sui campioni inviati presso l'Istituto di Genetica dell'Università di Berna è attualmente in corso.

3.2.10 Considerazioni

La casistica valutata conferma la manifestazione clinica della malattia descritta in letteratura.

Gli esami ematobiochimici ed emogasanalitici, non evidenziano parametri direttamente imputabili alla sindrome spastica.

Lo studio degli alberi genealogici ha portato alla individuazione di linee genetiche cui poter ricondurre il difetto, qualora ne fosse confermata la causa genetica.

3.3 La Paresi Spastica nella razza Romagnola

La Paresi Spastica bovina, definita anche “spastic lameness” dagli Autori anglosassoni e “Elsohacke” da alcuni Autori tedeschi (dal toro Elso che la trasmise a diversi discendenti), viene descritta per la prima volta nel 1922 da Hamoir (cit. da Baird et al., 1974,) in Belgio e, successivamente, da Wester nei Paesi Bassi come una forma di contrattura anormale del muscolo gastrocnemio. Successivamente, nel 1932 Götze utilizzò il termine “paresi spastica” per descrivere questa malattia neuromuscolare a carattere sporadico, caratterizzata da una iperstensione degli arti posteriori dovuta ad una patologica condizione dei muscoli che formano la corda del garretto*.

E' una malattia ad andamento ingravescente che colpisce prevalentemente giovani bovini di età compresa fra i 3 e gli 8 mesi di vita; sono comunque stati descritti rari casi ad insorgenza tardiva oltre i 36-38 mesi (Arnault, 1983; Chomiack et al., 1971) nonché delle eccezionali forme neonatali (Arnault, 1983; Harper, 1993).

Interessa in modo indifferente sia il maschio che la femmina praticamente di tutte le razze, anche le meticce.

L'elemento clinico dominante è rappresentato da una notevole apertura dell'angolo del garretto (“straight hock”) e, nei casi più gravi, da uno spostamento in senso posteriore e leggermente mediale dell'arto.

Con carattere più frequente tale deviazione compare solo in un arto, anche se sono possibili situazioni di coinvolgimento bilaterale. In questi casi, tuttavia, la bilateralità può essere mascherata dalla maggiore accentuazione dei sintomi a carico di un arto rispetto a quello controlaterale.

L'iperestensione dell'arto colpito è dovuta ad uno stato contrattuale dei muscoli estensori del piede, in particolare del muscolo gastrocnemio* e del muscolo flessore superficiale delle dita* (da notare che questo muscolo è certamente il flessore delle dita ma, contemporaneamente, è anche estensore del tarso e quindi del piede).

In alcuni casi il bicipite femorale, il semitendinoso, il semimembranoso, il quadricipite ed i muscoli adduttori possono intervenire nello stato contrattuale del treno posteriore (Dirksen, 1975).

3.3.1 *Ezio-Patogenesi*

Sulle cause capaci di determinare la paresi spastica diverse sono le ipotesi formulate.

Sin dalle prime osservazioni è subito sembrato chiaro che la malattia fosse da attribuirsi ad una eziologia di tipo genetico. Differenti sono state nel tempo le ipotesi riguardanti il tipo di ereditarietà, senza che si potesse tuttavia addivenire ad una caratterizzazione concordante.

Ad ulteriore complicazione si è posto inoltre il fatto, ormai unanimemente riconosciuto, che alla comparsa delle manifestazioni cliniche non siano estranei, in termini predisponenti od aggravanti, altre situazioni di natura nutrizionale/carenziale, ambientale od anche semplicemente individuali.

Le differenti possibilità relative al ruolo dell'intervento genetico nella comparsa della malattia vengono da Hanset et al. (1993) così riassunte:

1. gene dominante a penetranza incompleta;
2. gene unico responsabile di una maggiore suscettibilità alla malattia in caso d'esposizione a particolari fattori ambientali;
3. eredità poligenica con variazione continua della suscettibilità ad una causa esogena.

Nella estrema incertezza circa il tipo di ereditarietà, unico dato inoppugnabile allo stato attuale delle conoscenze riguarda la esclusione della eredità monogenica recessiva a penetranza completa. Dati basati sulla valutazione delle discendenze di coppie formate da soggetti entrambi malati, hanno mostrato che la comparsa della malattia non seguiva le classiche leggi della distribuzione genetica; nel caso in questione, infatti, tutta la prole avrebbe dovuto mostrare la patologia. Tra gli altri, si esprimono con certezza e credibilità al riguardo gli studi di van Huffel et al., (1986a e 1986b): essi, incrociando soggetti portatori di paresi spastica ottennero solo una quota parte di discendenza colpita dalla malattia (da tre coppie solo tre su un totale di 9 figli risultarono malati).

Accettata la variabilità della penetranza, difficoltà sorgono anche nella caratterizzazione di tipo dominante o recessivo.

Al di là delle considerazioni appena riportate, comunque, l'ipotesi ereditaria più accreditata è fondata su di un carattere monogenico, autosomico, recessivo, a penetranza incompleta (Thomason e Beeman, 1987).

Per quanto riguarda gli altri fattori che di volta in volta sono stati chiamati in causa come condizionanti o favorevoli la sindrome, pur nel contrasto delle diverse opinioni, citiamo:

- la carenza di manganese,
- l'assunzione per lungo tempo di latte materno rispetto al latte ricostituito, per carenza, in quello, di microelementi come il manganese (Van Huffel et al., 1986b)
- il pascolo su terreni simili al granito carenti di Ca, P, Cu, Zn, Co, I, Se (Arnault, 1982 e 1983)
- disturbi del metabolismo rame/zinco (Arnault, 1982 e 1983)
- carenza di vitamina A durante il primo mese di gravidanza (De Ley e De Moor, 1976)

In conclusione si può affermare che, allo stato attuale delle conoscenze, la paresi spastica si basa su di una predisposizione genetica alla malattia, che diventa clinicamente manifesta in determinate, ma per ora sconosciute, condizioni di tipo ambientale, nutrizionale od individuale.

Alla base dello stato contratturale del gastrocnemio, del flessore superficiale delle dita e degli altri muscoli di volta in volta eventualmente coinvolti, vi sarebbe una anomalia in eccesso del c.d. riflesso da stiramento (stretch reflex, in inglese), riflesso spinale sul quale si basa la regolazione del tono muscolare e quindi la propriocezione.

A favore del ruolo centrale di questo meccanismo si pongono i ripetuti studi di De Ley e De Moor.

Questi ricercatori, infatti, attraverso la resezione chirurgica delle vie afferenti spinali dorsali provenienti dal muscolo gastrocnemio (desafferentazione selettiva) riuscirono ad ottenere la scomparsa dello stato contratturale muscolare (De Ley e De Moor, 1977).

Che nell'attivazione del riflesso da stiramento nel caso della paresi spastica, la responsabilità sia da attribuirsi alla contrazione delle fibre intrafusali in seguito alla stimolazione da parte dei gamma motoneuroni, è confermato dagli ulteriori studi di De Ley e De Moor (1980), i quali risolsero lo stato contratturale attraverso il blocco selettivo con procaina delle fibre efferenti gamma.

Gli studi di questi autori, quindi, seppur non più recentissimi ma tuttora i più accreditati, basano la patogenesi della malattia su un disturbo neuromotorio extrapiramidale a

livello di regolazione spinale della propriocezione, assegnando responsabilità primaria ai gamma-motoneuroni.

Lo stato di eccitazione o di inibizione dei γ -motoneuroni, agendo in sinergismo con l'attività degli α -motoneuroni, partecipa al mantenimento del tono muscolare, così come anche alla contrazione «efficace» delle masse dei muscoli.

Nel caso della paresi spastica l'ipertono muscolare sarebbe conseguente ad una incontrollata sovrastimolazione del riflesso da stiramento conseguente ad una iperattività delle fibre gamma.

Allo stato attuale delle conoscenze, tuttavia, non è noto se il difetto sia dovuto ad una lesione intrinseca del γ -motoneuroni o ad un difetto da parte dei centri di controllo extrapiramidale (nucleo rosso e/o nucleo vestibolare), nel senso di aumentata eccitazione o viceversa di ridotta inibizione.

Questa interpretazione patogenetica viene condivisa anche da Bourke (1996), il quale basa le sue osservazioni non tanto direttamente sulla paresi spastica bensì sulla c.d. «paresi asimmetrica dell'arto posteriore».

In uno studio recente, test genetici eseguiti sul midollo spinale di vitelli sani ed affetti da paresi spastica ha dimostrato il coinvolgimento di oltre 200 geni. I risultati hanno suggerito che la malattia possa essere riconducibile ad un difetto nella trasmissione sinaptica (Pariset et al., 2013).

3.3.2 Quadro Dismorfico

Nelle fasi iniziali della malattia il dismorfismo scheletrico si manifesta solamente attraverso un verticaslismo dell'articolazione tibio-tarsica (angolo superiore ai 150°- anche se la dimensione dell'angolo non deve essere comunque considerata come criterio diagnostico nella valutazione della paresi spastica- , Rieck, 1965).

Con l'avanzare della malattia, la tuberosità calcaneale si solleva sempre più sull'estremità distale della tibiale ed il tarso viene portato in posizione estrema “a gamba di sedia” (Dirksen, 1975), così che è possibile osservare una increspatura della pelle all'altezza della corda del garretto (Empell et al., 1977).

Nelle forme più gravi questo stato di estrema contrattura di tipo clonico, cioè costantemente attivo, dei muscoli estensori si traduce in uno spostamento in senso

posteriore dell'arto, che può poggiare solo sulla punta degli unghioni o anche distaccarsi dal suolo. In questi casi l'animale tende a muoversi su "tre zampe"; non rara è l'osservazione durante l'andatura di movimenti di dondolamento o di oscillazione assiale dell'arto colpito. Questo particolare atteggiamento è da attribuirsi all'incapacità, durante il movimento, di flettere il garretto cui segue una maggiore escursione dell'articolazione coxo-femorale. Spesso si nota pure il dorso incarnato e la base della coda elevata. L'andatura appare incerta ed impacciata in ragione del fatto che l'alterata stazione quadrupedale tende a spostare il baricentro dell'animale in avanti con ripercussioni di appiombamento sugli arti anteriori (lieve flessione del carpo), probabile risposta al maggior carico sul treno anteriore (Weaver, 1991).

Se la lesione è presente in forma bilaterale, il paziente cambia spesso gamba d'appoggio oppure resta per lungo tempo in decubito sterno-laterale.

La sintomatologia sopra descritta è particolarmente accentuata dopo che l'animale passa dal decubito alla stazione quadrupedale, mentre è assente con il soggetto in decubito (Dewulf, 1982). In quest'ultimo caso è anche possibile la flessione passiva dell'angolo tibio-tarsico.

Alla palpazione il muscolo gastrocnemio si presenta duro e rigido, così come lo è la corda del garretto, ma non mostra aumentata sensibilità dolorifica né fenomeni flogistici infettivi.

Lo stato generale degli animali non è compromesso fino allo svezzamento: l'appetito, lo stato di nutrizione e la crescita sono persino ottimi in alcuni di questi vitelli (Götze, 1932).

Nel tempo la malattia, a carattere progressivo, porta ad uno scarso accrescimento o addirittura dimagrimento, penalizzando così le performance produttive.

La velocità di evoluzione della malattia non è comunque prevedibile.

La classificazione sintomatologica proposta da Arnault (1983) suddivide la malattia in quattro fasi consecutive:

- Fase "subclinica": comparsa di garretto dritto (straight hock), con andatura rigida, disarmonica, di tipo meccanico, senza la presenza di contrazioni ritmiche spastiche degli arti posteriori;

- Fase 1: garretto dritto con contrazioni spastiche ritmiche degli arti posteriori solamente quando l'animale si alza;
- Fase 2: forma tipica della malattia con garretto dritto e continue contrazioni spastiche del muscolo gastrocnemio (in forma mono- o bilaterale);
- Fase 3: forma avanzata, talvolta con contrazioni spastiche dei muscoli della groppa e dei lombi, più raramente degli arti anteriori.

Mai comunque vi sarebbe la contrazione dei muscoli della testa, collo, torace ed addome.

Sempre secondo Arnault (1983) l'intervallo di tempo fra ciascuna fase è estremamente variabile, ma in generale la forma subclinica varia da dieci giorni a due mesi e la fase uno non è più lunga di 25 giorni.

Una seconda classificazione, proposta da Empell et al., (1977), considera sempre la durata e la frequenza delle contrazioni muscolari, così come la disfunzione motoria derivante, ma distingue in quattro gradi l'intensità dei sintomi:

- Paresi spastica di 1° grado: sintomatologia caratterizzata da garretto dritto senza ripercussioni evidenti durante l'andatura. E' presente contrazione dei muscoli estensori del piede solo quando l'animale passa dal decubito alla stazione quadrupedale.
- Paresi spastica di 2° grado: sintomatologia caratterizzata da garretto dritto con evidenti contrazioni muscolari a carico dei muscoli estensori del piede, sia in stazione che durante l'andatura.
- Paresi spastica di 3° grado: sintomatologia caratterizzata da garretto dritto e piede spostato verso l'indietro. L'unghione poggia con la punta e può talvolta venire sollevato all'indietro. I muscoli estensori del piede sono costantemente contratti. La locomozione è compromessa in modo evidente.
- Paresi spastica di 4° grado: sintomatologia caratterizzata da garretto dritto e piede completamente sollevato da terra, spostato in senso caudale. Si possono notare frequenti movimenti oscillatori longitudinali dell'arto. I muscoli estensori del piede sono costantemente contratti con frequenti rinforzi spastici e l'andatura è a "tre gambe".

3.3.3 Quadro Diagnostico

L'esame radiologico del garretto colpito rileva un aumento dell'angolo articolare, osteoporosi ed esostosi della linea distale epifisaria tibiale, curvatura latero dorsale del calcaneo ed infine una maggiore ampiezza della linea epifisaria calcaneale. Queste alterazioni patologiche del quadro radiografico sono certamente da attribuirsi a delle anormali condizioni meccaniche di tutta l'articolazione causate dalla continua contrazione del muscolo gastrocnemio (Van Gastel-Jansen et al., 1962; Denniston et al., 1968; Baird et al., 1974; Thomason et al., 1987).

Le indagini sieroenzimatiche non hanno permesso di rilevare nessuna alterazione e solo gli enzimi muscolari sierici talvolta aumentano come conseguenza di spasmi muscolari (Baiard et al., 1974; De Ley et al., 1976; Thomason et al., 1987).

Alcune anomalie biochimiche sono state evidenziate a livello di liquido cefalorachidiano (De Ley et al., 1975): un calo significativo dell'acido omovanilico (principale metabolita della dopamina), della dopamina ed un leggero aumento dell'acido idrossindolacetico, catabolita della serotonina.

Sulla base di questi dati gli Autori concludono che il ridotto metabolismo della dopamina a livello di sistema nervoso centrale negli animali affetti da paresi spastica è indicativo di un disordine extrapiramidale, causa quindi di malattia. Questo a sua volta starebbe alla base di una squilibrata efferenza tra gli alfa ed i gamma motoneuroni che porterebbe ad un ipertono muscolare. Arnault (1983), per contro, imputa questo danno ad una anomalia del sistema serotoninergico (importante nel bovino), anche se una discreta deficienza non si accompagna ad uno scarto significativo del catabolita misurato (acido idrossindolacetico). Ad ogni modo i due sistemi sopraccitati sono in stretta relazione (Thiebot et al., 1996).

3.3.4 Quadro Anatomopatologico

La difficoltà interpretativa patogenetica è legata alla mancanza di lesioni anatomiche od istologiche a carico del sistema nervoso centrale e periferico, nonché a livello dei muscoli colpiti dallo spasmo (Harper, 1993).

Rare sono state le segnalazioni di fenomeni degenerativi quali vacuolizzazione e picnosi delle cellule giganti (Lewandowski et al., 1967; Hoppe et al., 1970, Chomiak et al., 1971, 1973; Chiocchetti et al., 2006) a carico del nucleo rosso dell'encefalo, cervelletto, bulbo e della sostanza reticolare del midollo spinale, ovvero nei centri piramidali del controllo e della mobilità (centri extrapiramidali).

Fenomeni di tipo artrosico della articolazione del garretto sono da attribuire al persistente disturbo posturale con conseguente anomala distribuzione del peso e degli insulti pressori.

3.3.5 Diagnosi Differenziale

Seppure la paresi spastica possa essere considerata di facile e diretto riconoscimento, di primaria importanza nel ragionamento diagnostico differenziale sono:

- la sindrome spastica, o paramioclonia;
- la lussazione dorsale della rotula;
- la paralisi del nervo peroneo.

In riferimento alla lussazione (dislocazione) dorsale della rotula, comunemente conosciuta anche con il nome di crampo rotuleo, è da sottolineare come in questo caso le articolazioni del ginocchio e del garretto siano completamente bloccate in estensione, resistenti anche alla flessione passiva.

Nella paresi spastica invece l'articolazione è ancora flessibile passivamente, per ritornare subito e rapidamente alla posizione estesa non appena cessa l'azione flettente.

In situazione di dislocazione rotulea dorsale, durante la deambulazione l'arto si mantiene costantemente rigido, bloccato in estensione, e viene trascinato come un bastone oppure proiettato verso l'esterno in semicerchio; una concomitante flessione del nodello fa sì che, all'avanzamento dell'arto, l'unghia strisci sul terreno (Dirksen, 1975).

Di solito la dislocazione della rotula si manifesta in maniera intermittente/ricorrente, con correzione spontanea durante il movimento (ginocchio a scatto) e conseguente

scomparsa completa della sintomatologia; questa ricompare però nel momento in cui il soggetto si ripositiona in stazione. Anche la risoluzione chirurgica porta a completa scomparsa dei sintomi.

Da richiamare ancora, in termini differenziali, lo stato contratturale del muscolo gastrocnemio, assente invece nel crampo rotuleo.

La paralisi del nervo peroneo (Dirksen, 1975) causa la impossibilità funzionale di flettere il garretto e di estendere il nodello. Ne consegue che in stazione il garretto viene mantenuto esteso mentre il nodello è flesso ed il soggetto si appoggia sul nodello/pastorale. Durante la deambulazione la gamba rimane estesa, mentre l'unghia striscia con la sua faccia dorsale sul terreno. Se si estende passivamente l'unghione si osserva una caratteristica risposta flessoria del nodello, per mancato controllo nervoso della articolazione medesima.

Altre patologie che devono essere considerate in diagnosi differenziale sono i fenomeni infiammatori, soprattutto cronici, dell'articolazione del ginocchio e/o del garretto, le fratture pelviche o sacrali, la rara dislocazione del muscolo bicipite femorale, la paresi asimmetrica dell'arto posteriore (Bourke, 1996), la mieloencefalopatia progressiva degenerativa bovina (malattia genetica autosomale recessiva tipica della razza Bruna alpina), la rottura della fascia lata.

3.3.6 Approccio Terapeutico

Seppure in letteratura vengano riportate successi terapeutici sperimentali utilizzando gluconato di litio (Arnault, 1982 e 1983), da un punto di vista pratico l'unica possibilità di intervento è di tipo chirurgico. La risoluzione della malattia non va vista comunque come soluzione definitiva del problema, ma solo come un provvedimento volto a consentire all'animale di raggiungere un adeguato peso di macellazione.

Due sono i metodi chirurgici proposti:

1) tenotomia :

- a) porzione superficiale e profonda del tendine del gastrocnemio e metà del tendine del flessore superficiale delle dita (la zona di resezione è posta circa 8-12 cm sopra la tuberosità calcaneale, laddove il gastrocnemio gira intorno al flessore) (metodo

classico di Goetze). In alternativa si può lasciare intatta la porzione profonda del gastrocnemio.

b) porzione superficiale e profonda del tendine del gastrocnemio, con risparmio del tendine del flessore superficiale delle dita.

2) neurectomia del nervo tibiale (aggredendo il nervo tra il capo e i due capi del muscolo lungo vasto, (ovvero fra il paramerale ed il bicipite femorale).

3.3.7 Casistica Osservata

Nel periodo tra Gennaio 2014 e Dicembre 2016 sono stati segnalati al Servizio di Buiatria 7 casi di Sindrome Spastica (Tabella 8).

Tabella 8 - Casistica osservata

N° rif	Razza	Sesso	Età	Provincia
72/14	Frisona	Femmina	2anni	Modena
108/14	Romagnola	Maschio	1anno	Forlì
71/15	Romagnola	Maschio	10mesi	Firenze
88/15	Frisona	Femmina	2anni	Modena
89/15	Frisona	Femmina	2anni	Modena
270/16	Romagnola	Femmina	6mesi	Forlì
340/16	Romagnola	Femmina	4mesi	Bologna

Tutti i soggetti sono stati sottoposti ad esame clinico; per un soggetto (72/14) la diagnosi è rimasta dubbia, pertanto l'animale è stato ricoverato presso il Servizio di Buiatria per approfondimenti diagnostici.

Per tutti i soggetti di razza Romagnola è stato studiato l'albero genealogico, e sia dagli stessi che da almeno un genitore è stato raccolto materiale biologico (sangue EDTA).

In nessun caso per i soggetti di razza Frisona è stato possibile studiare il pedigree ed ottenere materiale biologico dai genitori.

3.3.8 Quadro Clinico

Tre soggetti provenivano dallo stesso allevamento di vacche da latte, nella provincia di Modena; gli animali di razza Romagnola afferivano ad allevamenti diversi dell'area appenninica Tosco-Emiliano-Romagnola. Tutti allevati in modo semintensivo.

All'esame clinico tutti gli animali mostravano discrete condizioni generali di salute e nutrizione, stato del sensorio vigile e attento, ma atteggiamento anomalo del bipede posteriore.

Tutti i casi di razza Romagnola erano affetti da una forma di paresi spastica monolaterale, da lieve a grave. I soggetti con malattia al 2°-3° grado, presentavano garretto dritto e contrazioni muscolari a carico dei muscoli estensori del piede quando passavano dal decubito alla stazione, e in minor misura durante l'andatura. Alla palpazione il muscolo gastrocnemio si presentava duro e rigido, così come la corda del garretto, in alcuni soggetti vi era anche aumento del tono muscolare dei muscoli semimembranoso, semitendinoso e quadricipite femorale (Figura 24).



Figura 24- Vitello 340/16

In un caso, l'unghione veniva posato solo in punta e la base della coda mantenuta sollevata (Figura 25).



Figura 25- Vitello 108/14

Un solo animale era affetto dalla forma di paresi spastica di 4° grado. Il garretto era diritto e il piede completamente sollevato da terra, spostato in senso caudale (Figura 26). I muscoli estensori del piede erano costantemente contratti con frequenti rinforzi spastici e l'andatura a "tre gambe", con oscillazioni dell'arto colpito.



Figura 26- Vitello 71/15

I due soggetti di razza Frisona, visitati in azienda, erano affetti da paresi spastica di 1° grado, monolaterale. All'ispezione si evidenziava un verticaslismo dell'articolazione tibio-tarsica, alla palpazione il muscolo gastrocnemio era ipertonico, la corda del garretto dura. L'andatura rigida, ma non zoppicante.

La vacca 72/14, quando in stazione, tendeva l'arto posteriore all'indietro mantenendolo leggermente sollevato (Figura 27), lentamente poi cominciava ad appoggiarlo a partire dall'unghione (Figura 28) finchè gradualmente il nodello si fletteva fino all'appoggio completo (Figura 29). In questa posizione il garretto appariva tendenzialmente dritto. Se invitata alla deambulazione, il piede veniva flesso e portato in avanti per poi essere respinto all'indietro senza mai poggiare a terra.

Al fine di indagare la funzionalità neuromuscolare, è stata eseguita una elettromiografia ad ago, con soggetto in stazione, dei muscoli: gastrocnemio, quadricipite femorale, tibiale craniale, estensore lungo delle dita e flessore profondo delle dita.

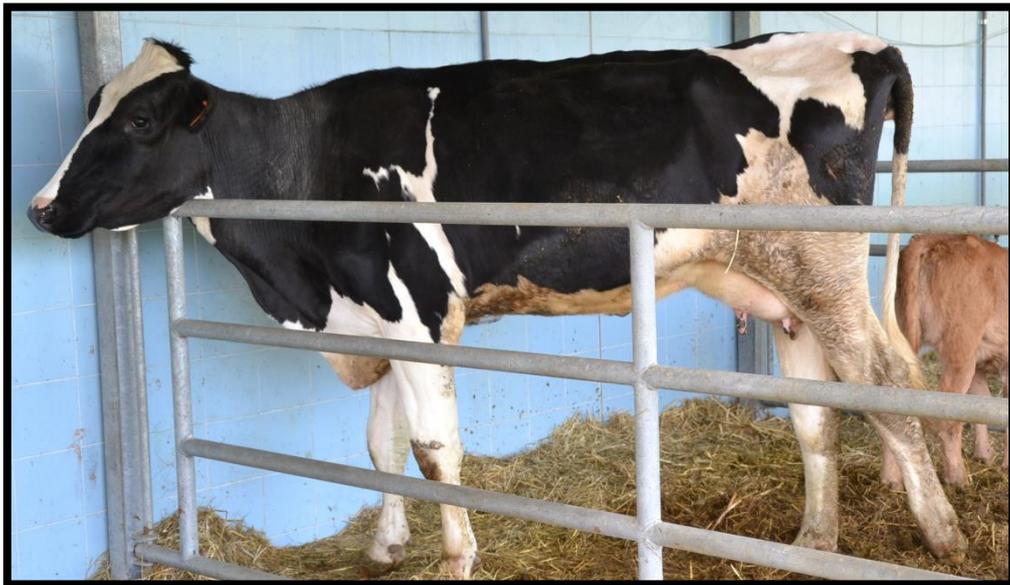


Figura 27- Vacca 72/14



Figura 28 e Figura 27- Vacca 72/14

3.3.9 Quadro Elettromiografico

L'esame elettromiografico della vacca 72/14 mostrava la presenza di potenziali di unità motoria di aspetto normale, la loro frequenza tuttavia era maggiore nel muscolo gastrocnemio di entrambi gli arti. In nessuno dei muscoli indagati si è registrata la presenza di attività elettrica spontanea patologica.

L'assenza di attività spontanea patologica ha permesso di escludere la presenza di denervazione dei muscoli valutati e quindi di alterazioni a carico del nervo sciatico, tibiale, peroneo e femorale. L'iperattività registrata a carico del muscolo gastrocnemio è suggestiva della presenza di paresi spastica.

3.3.10 Studio Del Pedigree

L'analisi del pedigree dei soggetti di razza Romagnola non mostrava parentele strette tra i soggetti segnalati, né tra i relativi progenitori.

Solo in un caso sono stati evidenziati antenati sani, ma noti per aver dato prole affetta da paresi spastica.

In due, invece, gli antenati erano connessi a prole affetta da un'altra malattia genetica della razza Romagnola (Sindrome del vitello pancione) e per malformazioni congenite.

3.3.11 Studio Del Genotipo

L'analisi genetica sui campioni inviati presso l'Istituto di Genetica dell'Università di Berna è attualmente in corso.

3.3.12 Considerazioni

La casistica valutata conferma la manifestazione clinica della malattia descritta in letteratura.

La distribuzione dei casi osservati risulta disomogenea per area, tipologia di allevamento e razza. Tale dato depone da un lato, per la presenza di fattori localistici favorevoli all'estrinsecazione della malattia, dall'altro, per una particolare suscettibilità di specifiche linee genealogiche.

Sulla natura di tali fattori (tossici, ambientali, nutrizionali) e sulla predisposizione genetica dei singoli soggetti sono necessari ulteriori approfondimenti.

Nel confronto con la medicina umana la Paresi spastica del bovino potrebbe costituire un modello di studio per con le cosiddette paraplegie spastiche familiari.

Nell'uomo con *Paraplegia Spastica Familiare* (PSF) si intende un gruppo di malattie ereditarie caratterizzate da debolezza muscolare e spasticità (aumento del tono muscolare) lentamente progressive coinvolgenti gli arti inferiori con conseguenti problemi nella deambulazione. La prevalenza è stimata a 3-10 casi ogni 100.000 in Europa. L'età di insorgenza è variabile, dall'infanzia sino all'età adulta. Clinicamente le paraparesi spastiche familiari possono essere suddivise in forme "pure", caratterizzate da spasticità a decorso cronico ingravescente a carico degli arti inferiori; e forme "complicate" caratterizzate dalla presenza di disturbi neurologici e non neurologici correlati.

Le paraparesi spastiche ereditarie vengono inoltre classificate in base alla loro modalità di trasmissione in forme autosomiche dominanti, autosomiche recessive e X-linked e in rapporto con i loci genici correlati qualora siano conosciuti. Ad oggi sono stati mappati più di 30 loci responsabili di forme "pure" e "complicate"; tuttavia, nonostante il loro numero elevato e continuamente in crescita, soltanto 11 geni autosomici e 2 geni legati al cromosoma X sono stati identificati e il meccanismo patogenetico alla base della maggior parte delle forme di PSF non è stato ancora identificato.

Capitolo 4

DISCUSSIONE

L'elevata consanguineità sviluppatasi nella popolazione bovina ha incrementato il rischio di comparsa di malattie genetiche. Infatti, la selezione di un ristretto numero di riproduttori avviene valutando il fenotipo senza conoscere precisamente i geni compresi nell'espressione del tratto di interesse. Questa scarsa variabilità genetica ha favorito l'incontro di geni recessivi mutati nel genotipo dei discendenti. Tale considerazione trova maggior riscontro allorché accada in una determinata razza o addirittura in una linea genetica specifica.

Uno dei più grandi problemi nel controllo delle malattie genetiche è che queste si rivelano solo anni dopo che la mutazione è avvenuta, quando ormai l'allele recessivo difettoso è diffuso nella popolazione. Per questa ragione è estremamente importante associare il fenotipo patologico al difetto genetico. La segnalazione di diversi casi di Cataratta giovanile, Nanismo acondroplastico e Xantinuria avvenuta in un arco di tempo ristretto esemplifica come una malattia ad incidenza rara possa diffondersi all'interno di una popolazione e diventare improvvisamente una problematica per allevatori e produttori di razza. In questa casistica si è visto come i progressi avvenuti nella genetica molecolare consentono oggi di identificare le mutazioni che causano la comparsa di anomalie.

Per la Sindrome spastica e la Paresi spastica la necessità di continuare a reperire la casistica è legata al fatto che ancora non è stata raggiunta la diagnosi genetica di malattia. La possibilità di osservare le caratteristiche fenotipiche degli animali affetti e di raccogliere campioni biologici, rimane la condizione necessaria per affrontare lo studio di una malattia genetica. È compito del veterinario non solo identificare la patologia ma anche sensibilizzare gli allevatori a denunciare queste problematiche, valutare le possibili cause, stimare l'eventuale rischio di ereditarietà e individuare i possibili agenti teratogeni presenti nell'ambiente.

Capitolo 5

BIBLIOGRAFIA

- Agerholm J.S., Christensen K., Nielsen S.S., Flagstad P. (2009) “*Bovine renal lipofuscinosis: prevalence, genetics and impact on milk production and weight at slaughter in Danish cattle*”, Acta Vet. Scand., 51:7.
- Arita Y. (1988) “*Patho-morphological observations on muscles and nerves of pelvic limbs in cows with spastic syndrome*”, Japanese Journal Veterinary Research, 36:147.
- Arnault G.A. (1982) “*Bovine spastic paresis. An epidemiologic, clinical and therapeutic study in a charolais practice in France. Efficacy of lithium therapy*”, Proc. 12th World Congress on Diseases of Cattle, Amsterdam, The Netherlands, vol. 2, 853-858.
- Arnault G.A. (1983) “*Bovine spastic paresis. An epidemiologic, clinical and therapeutic study in a charolais practice in France. Efficacy of lithium therapy*”, Bovine Practitioner, 18:236-240.
- Ate I.U., Rekwot P.I., Nok A.J., Tekdek L.B. (2011) “*Congenital ocular defects in bunaji-friesian calves associated with vitamin A deficiency in settled cattle herds in Zaria*”, Northern Nigeria Indian Cow, 7:26–33.
- Baird J.D., Johnson K.G., Hartley W. (1974) “*Spastic paresis in Friesian calves*”, Austriac Veterinary Journal, 50:239-245.
- Benazzi C.; Dittmer K.E.; Thompson K.G.; Drögemüller C.; Gentile A.; Muscatello L.V.; Murgiano L.; Piffer C.; Bolcato M.; Brunetti B., (2014) “*Preliminary pathological results on chondrodysplastic dwarfism in Tyrolean Grey cattle due to deletion in the EVC2 gene*”, New Zealand Veterinary Journal, 62:306-306.
- Beker R.B. Wilcox C.J., Pritchard W.R. (1981) “*Crampy or progressive posterior paralysis in mature cattle*”, Journal of Dairy Science, 44:542-547.

- Bourke C.A. (1996) "*Bovine asymmetric hind limb paresis, a presumptive in utero plant poisoning*", *Austriac Veterinary Journal*, 63:42-45.
- Bortolami R., Callegari E. (1999) "*Neurologia ed Estesiologia degli animali domestici*", ed. Edagricole, Bologna, pp. 5-13.
- Cabassi E., Borghetti P. (2002) "*Sistema locomotore*", in Marcato P.S., *Patologia Sistemica Veterinaria*, ed Edagricole, Bologna, pp. 1163-1165.
- Câmara A.C.L., Alfonso J.A.B., Costa N.A., Mendonça C.L., Souza M.I. (2008) "*Spastic syndrome in two cows in Northeastern Brazil*", *Revista portuguesa de ciências veterinárias*, 103:100-102.
- Camino E., Antonietti S. (1998) "*L'attività muscolare volontaria e involontaria*", in Aguccini G., Beghelli V., Clementi M.G., D'Angelo A., Debenedetti A., Facello C., Giulio L.F., Guglielmino R., Lucaroni A., Maffeo G., Marongiu A., Naitana S., Nuvoli P., Piazza R., *Fisiologia degli Animali Domestici con elementi di Etologia*, ed. Utet, Torino, pp. 47-105.
- Carter A. (1960) "*An inherited blindness (cataract) in cattle*", In *Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod.*, 20:108.
- Cheli R. (1958) "*Sulla sindrome spastica del bovino*", in *La Nuova Veterinaria*, 12:291-295.
- Cheli R. (1988) "*Manifestazioni paretico-spastiche del bovino*", in Cheli R., *Clinica chirurgica veterinaria*, ed. Torinese, Torino, pp. 749-752.
- Chew E.Y. (2013) "*Nutrition effects on ocular diseases in the aging eye*", *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 54: ORSF42–47.
- Chiocchetti R., Grandis A., Bombardi C., Joechler M., Gentile A. (2006) "*Bulbo-pons-mesencephalic projections to the lumbo-sacral spinal cord in healthy and spastic paresis-affected cattle: A comparative investigation*", *Veterinary Research Communications*, 30(1):175–177.
- Chomiak M., Milart Z., Hoppe R. (1971) "*Altérations du système nerveux chez un taureau atteint de peresis spastica chronique*", *Révue Med. Vet.*, 122 (8-9):867-879.

- Chomiak M., Lakomi M., Sztejn S., Milart Z. (1973) “*Weitere histopathologische Untersuchungen des Zentralnervensystems bei der Paresis spastica des Rindes*”, Arch. Exp. Vét., 27:791-798.
- Churchill A., Graw J. (2011) “*Clinical and experimental advances in congenital and paediatric cataracts*”, Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci., 366:1234–1249.
- Detlefson J.A., Yapp W.W. (1920) “*The inheritance of congenital cataract in cattle*”, Amer. Nat. , 54: 277–280.
- Denniston J.C., Shive R. J., Friedli U., Boucher W.B. (1968) “*Spastic paresis syndrome in calves*”, J.A.V.M.A., 152(8):1138-1149.
- Dirksen G. (1975) “*Malattie dell’apparato locomotore*” in Rosenberger G., Malattie del Bovino, ed Essegivi, Piacenza, pp. 497-500.
- Dirksen G. (2004) “*Malattie degli organi del movimento*” in Dirksen G., Gründer H.D., Stöber M., Medicina Interna e Chirurgia del Bovino, ed. Le Point Veterinarie Italie, Milano, pp. 753-1029.
- Empel W., Hoppe R., Karczewski W. (1977) “*Variation in the clinical picture of bulls with paresis spastica*”, Medycyna Weterynaryjna, 33:263-266.
- Eurell J.A. (2000) “*Tessuto muscolare*”, in Dellmann H.D. e Eurell J.A. (edizione italiana a cura di Bortolami R. e Lucchi M.L.) Istologia e Anatomia Microscopica Veterinaria, ed. Ambrosiana, Milano, p. 115.
- Famigli Bergamini P., Chiocchetti R., Moretti M., Gentile A., Boari A. (1995) “*Alterazioni istomorfologiche del midollo spinale in tori con “sindrome spastica”*”, Atti della Società Italiana di Buiatria, 27:519-521.
- Fraichiger E., Hofmann W. (1941) “*Die Nervenkrankheiten des Rindes*”, Fraichiger E., Hofmann W., Medizinischer Verlag Hans Huber, ed. Huber, Berlino, pp. 310-312; 337-340.
- Galdzicka M., Patnala S., Hirshman M.G., Cai J.F., Nitowsky H., et al. (2002) “*A new gene, EVC2, is mutated in Ellis-van Creveld syndrome*”, Mol. Genet. Metab. 77:291–295.

- Gelatt K.N. (1971) “*Cataracts in cattle*”, J. Am. Vet. Med. Assoc., 159:195.
- Gelatt K.N., Das N.D. (1984) “*Animal models for inherited cataracts: a review*”, Curr. Eye Res., 3:765–778.
- Göetze R. (1932) “*Spastische Parese der hinteren Extremität bei Kälbern und Jungrindern*”, Dtsch. Tierärztl. Wschr., 40:197-200.
- Gründer H.D. (2004) “*Malattie dell’apparato urinario*” in in Dirksen G., Gründer H.D., Stöber M., Medicina Interna e Chirurgia del Bovino, ed. Le Point Veterinarie Italie, Milano, pp. 697-736.
- Hayashi, M., Ide, Y., Shoya, S., Enomoto, C. and Mizoguchi, H. (1979) “*Observation of xanthinuria and xanthine calculosis in beef calves*”, Jpn. J. Vet. Sci. 41:505–510.
- He W., Li S. (2000) “*Congenital cataracts: gene mapping*”, Hum. Genet., 106:1–13.
- Huang B., He W. (2010) “*Molecular characteristics of inherited congenital cataracts*”, Eur. J. Med. Genet. 53:347–357.
- Hejtmancik J.F. (2008) “*Congenital cataracts and their molecular genetics*”, Semin. Cell. Dev. Biol., 19:134–149.
- Hejtmancik J.F., Shiels A. (2010) “*Genetics of congenital cataract*”, in Dartt D.A., Besharse J., Dana R., Encyclopedia of the eye, ed. Elsevier, New York.
- Harper P.A.W. (1993) “*Spastic paresis in Brahman crossbred cattle*”, Aust. Vet. J., 70(12):456-457.
- Hanset R., Serteyn D., Grobet L., Michaux C. (1993) “*La parésie spastique des gastrocnémiens et son hérédité*”, Ann. Med. Vet., 137:237-247.
- Hässig M., Jud F., Naegeli H., Kupper J., Spiess M. (2009) “*Prevalence of nuclear cataract in Swiss veal calves and its possible association with mobile telephone antenna base stations*”, Schweiz Arch. Tierheilkd, 151:471–478.

- Hirano T., Kobayashi N., Itoh T., Takasuga A., Nakamaru T., Hirotsune S., Sugimoto Y. (2002) “Null mutation of *PCLN-1/Claudin-16* results in bovine chronic interstitial nephritis”, *Genome Res.*, 10:659-63.
- Hoppe R., Chomiak M., Milart Z. (1970) “A case of spastic paresis of legs in the bull of black white breed”, *Med. Wet.*, 26:467-470.
- Lafortune J.G. (1956) “Une affection spasmodique des bovins”, *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 20:206-215.
- Lewandowski M., Chomiak M., Milart Z., Rutkowski A. (1967) “A case of spastic paralysis of cattle in a bull”, *Medycyna Vet.*, 23:409-413.
- Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M. (1999) “*Fondamenti di neuroscienze e del comportamento*”, ed. Ambrosiana, Milano, pp. 525-552.
- Meozzi A. (2013) “*Malattie rare, malattie genetiche e distretto oro-cranio-facciale*”, ed. ETS, Pisa, pp. 21-25.
- Mesa R., Bassnett S. (2013) “*UV-B-induced DNA damage and repair in the mouse lens*”, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 54: 6789–6797.
- Messieri A., Moretti B. (1982) “*Semiologia e Diagnostica Medica Veterinaria*”, ed. Tinarelli L., Bologna, pp. 29-39.
- Molinaro M. (2003) “*Tessuto muscolare*”, in Adamo S., Carinci P., Molinaro M., Sircusa G., Stefanini M., Ziparo E., *Istologia di V. Monesi*, ed. Piccin, Padova, pp. 702-755.
- Molinaro M. (2012) “*Tessuto muscolare*”, in Adamo S., Comoglio P., Dolfi A., Molinaro M., Pappacio G., Stefanini M., Ziparo E., *Istologia di V. Monesi*, ed. Piccin, Padova, pp. 483-551.
- Murgiano L., Jagannathan V., Calderoni V., Joechler M., Gentile A., Drögemüller C. (2014a) “*Looking the Cow in the Eye: Deletion in the NID1 Gene Is Associated with Recessive Inherited Cataract in Romagnola Cattle*”, *PLoS ONE* 9:e110628.

- Murgiano L., Drögemüller C., Sbarra F., Bolcato M., Gentile A. (2014b) "*Prevalence of paunch calf syndrome carriers in Italian Romagnola cattle*" *Veterinary Journal*, 3:459-461.
- Murgiano L., Jagannathan V., Benazzi C., Bolcato M., Brunetti B., Muscatello L.V., Dittmer K., Piffer C., Gentile A., Drögemüller C. (2014c) "*Deletion in the EVC2 Gene Causes Chondrodysplastic Dwarfism in Tyrolean Grey Cattle*", *PLoS ONE* 9(4):e94861.
- Murgiano L., Jagannathan V., Piffer C., Immaculada Diez-Prieto Bolcato M., Gentile A., Drögemüller C. (2016) "*A frameshift mutation in MOCOS is associated with familial renal syndrome (xantinuria) in Tyrolean Grey cattle*", *Vet. Research* 12:276.
- Muscatello L.V., Benazzi C., K. E. Dittmer K.E., K. G. Thompson K.G., L. Murgiano L., C. Drögemüller C., Avallone G., Gentile A., Edwards J.F., Piffer C., Bolcato M., Brunetti B. (2015) "*Ellis–van Creveld Syndrome in Grey Alpine Cattle: Morphologic, Immunophenotypic, and Molecular Characterization*", *Veterinary Pathology*, 52:957-966.
- Nicholas F.W. (2003a) "*Is It Inherited?*", in Nicholas F.W. *Introduction to Veterinary Genetics*, ed. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, pp.134-140.
- Nicholas F.W. (2003b) "*Basic Genetics*", in Nicholas F.W. *Introduction to Veterinary Genetics*, ed. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, pp.1-42.
- Noden D.M., DeLahunta A. (1991) "*Cause di malformazioni congenite*", in *Embriologia degli animali domestici*, ed. Ermes, Milano, pp. 91-93.
- OMIA "*Online Mendelian Inheritance in Animal*", <http://omia.angis.org.au/>
- OMIM "*Online Mendelian Inheritance in Man*", <http://www.omim.org/>
- ORPHA "*Orphanet*", <http://www.orpha.net/>
- Osborne, C. A., Lulich, J. P., Bartges, J. W., Ulrich, L. K., Koehler, L. A., Bird, K. A., Swanson, L. L., Austin, G. W., Prien E. L. Jr, and Steinam, K. U. (1999) "*Drug-induced urolithiasis*", *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 29: 251–266.

- Pariset L., Bongiorno S., Bueno S., Cesare Gruber EM., Prosperini G., Chillemi G., Bicorgnia S., Gentile A., Valentini A. (2013) “*Microarray gene expression profiling of neural tissues in bovine spastic paresis*”, *Veterinary Research*, 9:122.
- Pazzaglia P. (2008) “*I sistemi di moto e cervelletto*” in Pazzaglia P., *Clinica Neurologica*, ed. Esculapio, Bologna, p.77
- Preiss H. (1967) “*Therapie-Versuche bei der Krämpfigkeit des Rindes*”, *Tierärztliche Umschau Journal*, 22:21-25.
- Rantanen E., Hietala M., Kristofferson U., Nippert I., Schmidtke J., Sequeiros J., Kääriäinen H. (2008) “*What is ideal genetic counselling? A survey of current international guidelines*”, *Eur. J. Hum. Genet.*, 16(4):445-452.
- Ribble C.S., Janzen E.D (1987) “*Congenital skeletal deformity syndrome (Letter)*”. *Can. Vet. J.*, 28: 160.
- Richter J., Göetze R. (1986) “*Patologia del prodotto del concepimento*”, in Richter J., Göetze R., *Ostetricia Veterinaria*, ed. Ambrosiana, Milano, pp.531-558.
- Rieck G.W., Leipold H.W. (1965) “*Untersuchungen über die pathogenischen Beziehungen der Steilstellung der Hintergliedmassen beim Rind zur spastischen Parese*”, *Zbl. Vet. Med.*, 12(6):559-579.
- Roberts S.J. (1965) “*Hereditary spastic syndrome disease affecting cattle in New York State*”, *The Cornell Veterinarian Journal*, 55:637-644.
- Rosemberg G. (1996) “*Paramioclonia*”, in Rosemberg G., *Malattie del Bovino*, ed. Edagricole, Bologna, pp. 500-502.
- Ruiz-Perez V.L., Goodship J.A. (2009) “*Ellis-van Creveld syndrome and Weyers acrodistal dysostosis are caused by cilia-mediated diminished response to hedgehog ligands*”, *Am. J. Med. Genet. C. Semin. Med. Genet.* 151:341–351.
- Scott P.R., Penny C.D., Macrae A.I. (2011) “*Spastic Syndrome*”, in Scott P.R., Penny C.D., Macrae A.I., *Cattle Medicine*, ed. Manson, Londra, pp. 191-192.

- Seifi H.A., Karimi K., Movasseghi A.R. (1997) “*Renal amyloidosis in cattle - a case report in Iran*”, Zentralbl. Veterinarmed B., 44:631-3.
- Siracusa G. (2002) “*Tessuto Osseo*”, in Monesi V., Istologia, ed Piccin, Padova, pp.532-544.
- Shiels A., Bennett T.M., Hejtmancik J.F. (2010) “*Cat-Map: putting cataract on the map*”, MolVis 16:2007–2015.
- Smedegaard H.H. (1964) “*Krämpfigkeit beim Rinde*”, Nordisk veterinærmedicin, 16:2029-1049.
- Sponenberg D.P., Vanvleck L.D., McEntee K., (1985) “*The genetics of the spastic syndrome in dairy bulls*”, Veterinary Medicine, 80:92-94.
- Stöber M. (2004) “*Malattie degli organi di senso*” in Dirksen G., Gründer H.D., Stöber M., Medicina Interna e Chirurgia del Bovino, ed. Le Point Veterinarie Italie, Milano, pp. 1171-1201.
- Takeda H., Takami M., Oguni T., Tsuji T., Yoneda K., et al. (2002) “*Positional cloning of the gene LIMBIN responsible for bovine chondrodysplastic dwarfism*”, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 10549–10554.
- Tenszen A. (1998) “*Spastic syndrome in a Canadian Hereford bull*”, Canadian Veterinary Journal, 33:716-717.
- Testoni S., Mazzariol S., Drögemüller C., Piffer C., Aresu L., Gentile A. “*Renal dysplasia in grey Alpine breed cattle unrelated to CLDN16 mutations*”, Vet. Rec., 170:22.
- Thiebot M.H., Rocchi M. (1996) “*Un agent multiple: la serotonine*”, Pour la science, 221:82-89.
- Thomason K.J., Beeman K.B. (1987) “*Spastic paresis in gelbvieh calves: an examination of two cases*”, Vet. Med., 82:548-553.
- Van Gastel-Jansen A., Frederik G.H. (1962) “*Pathological Changes in the Tarsi of Cattle Suffering from Paresis Spastics, Examined by Means of X-Rays*”, Vet. Rec., 74(46):260-263.

- Van Huffel X., De Moor A., Lampo Ph. (1986a) “*Bovine spastic paresis: genetic and environmental factors*”, Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift, 55:21-30.
- Van Huffel X., De Moor A., Lampo Ph., De Ley G. (1986b) “*The effect of calf feeding on the occurrence of spastic paresis in a genetically predisposed herd*”, Proc.14th World Congress on Diseases of Cattle, Dublin, Ireland, vol. 1, 104-109.
- Venable J.H., Delmann H.D. (1981) “*Tessuto muscolare*” in Delmann H.D., Brown E.M., *Istologia e Anatomia microscopica Veterinaria*, ed. Grasso, pp. 113-127.
- Weaver J. (1922) “*Lahmeheiten bei Kühen*”, Deut. Tierärztl. Wochenschr., 30:425-428.

Capitolo 6

PUBBLICAZIONI SCIENTIFICHE

Muscatello LV, Benazzi C, Dittmer K, Thompson KG, Drögemüller C, Gentile A, Murgiano L, Piffer C, **Bolcato M**, Brunetti B. (2014) “*Ellis-Van Creveld (EVC-2) Syndrome In Tyrolean Grey cattle: morphological study of a type of Chondrodysplastic dwarfism*” Atti XI Convegno AIPVe, Pisa, 16-18 giugno 2014, pag. 220.

Murgiano L., Jagannathan V., Benazzi C., **Bolcato M.**, Brunetti B., Muscatello L.V., Dittmer K., Piffer C., Gentile A., Drögemüller C. (2014) “*Deletion in the EVC2 gene causes chondrodysplastic dwarfism in Tyrolean Grey cattle*” PLoS ONE 9(4): e94861. doi:10.1371/journal.pone.0094861.

Righi C., Maresca C., Filippini G., Sylla L., **Bolcato M.**, Gentile A. (2014) “*Besnoitiosi bovina cronica: casi sintomatici in Italia*” Poster XLVI Congresso Nazionale SIB, Palermo, 29-31 maggio, 2014.

Murgiano L., Drögemüller C., Sbarra F., **Bolcato M.**, Gentile A. (2014) “Prevalence of paunch calf syndrome carriers in Italian Romagnola cattle” Veterinary Journal, 3:459-461. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.03.020>.

L. V. Muscatello, C. Benazzi, K. E. Dittmer, K. G. Thompson, L. Murgiano, C. Drögemüller, G. Avallone, A. Gentile, J. F. Edwards, C. Piffer, **M. Bolcato**, and B. Brunetti (2015) “*Ellis–van Creveld Syndrome in Grey Alpine Cattle: Morphologic, Immunophenotypic, and Molecular Characterization*” Veterinary Pathology; 52(5): 957-966 .

Bianchi E., Bombardi C., Bassi P., **Bolcato M.**, Gentile A., Militerno G. (2015) "*Bilateral trochlear nerve palsy as a consequence of cerebellar medulloblastoma: clinical and pathological findings*" *Journal of Veterinary Internal Medicine*; 29(4): 1117-1121.

M. Levi, K. E. Dittmer, A. Gentile, A. Beltrame, M. Morgante, E. Fiore, **M. Bolcato** and C. Benazzi (2016). "*Growth plate lesions of 62 fattening bulls at the abattoir in the northeast of Italy*" Poster 34th ESVP Meeting of the European Society of Veterinary Pathology - 27th ECVF Meeting of the European College of Veterinary Pathologists, 7-10 settembre 2016, Bologna.

Murgiano L., Jagannathan V., Piffer C., Immaculada Diez-Prieto, **Bolcato M.**, Gentile A., Drögemüller C. (2016) "*A frameshift mutation in MOCOS is associated with familial renal syndrome (xantinuria) in Tyrolean Grey cattle*", *Vet. Research* 12:276.

Ringraziamenti

Ringraziare tutti coloro che hanno partecipato, hanno permesso o addirittura sono stati indispensabili nella mia attività di ricerca mi viene impossibile, tuttavia ci sono persone che meritano un grazie particolare.

Ringrazio innanzitutto il Professor Gentile per avermi guidata in questi anni di studio e per avermi contagiata con la sua grande passione per questa disciplina.

Un doveroso ringraziamento al Dottor Dröegemüeller e al Dottor Murgiano per la disponibilità e la competenza; ai colleghi del Servizio di Anatomia Patologia per il supporto tecnico, e non solo; ai liberi professionisti e alle associazioni di allevatori che hanno segnalato i casi e permesso il ricovero degli animali; agli studenti interni al Servizio di Buiatria per l'immane entusiasmo.

Infine, un grazie di cuore alla mia famiglia, al mio compagno e ai miei carissimi amici per l'affetto e l'infinita pazienza dimostratemi.