

LO SCREENING ISTOLOGICO NELLA PREVENZIONE DELL'USO DI ANABOLIZZANTI NEL BOVINO*

**BARTOLOMEO BIOLATTI¹, ENRICO CABASSI², ROBERTO ROSMINI⁴,
MARIA GROOT⁵, MASSIMO CASTAGNARO³, ROBERTO BENEVELLI⁶,
GISBERTO GILIOLI⁶, ALDO GHIZZINARDI⁶, PIERO GIORGI⁷,
CLAUDIO MAZZINI⁷, FEDERICO COMELLINI⁸, LEONARDO ALBERGHINI⁴,
GABRIELE ZANCANARO¹, TIZIANA CANNIZZO¹, STEFANO AMEDEO¹,
LISA POPPI³, ANNAMARIA CANTONI²**

¹ Dipartimento di Patologia Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria di Torino, Università degli Studi di Torino

² Dipartimento di Salute Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Parma

³ Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata ed Igiene veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria di Padova

⁴ Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Bologna

⁵ Department of Food Safety and Health, RIKILT-DLO, Netherlands

⁶ CONAZO; ⁷ COOP Italia; ⁸ Libero Professionista

Al fine di fornire maggiori garanzie al consumatore sull'assenza di residui di farmaci ad attività ormonale non consentiti nelle carni e nei prodotti derivati, gli autori propongono l'adozione dell'esame istologico nello screening per il rilievo di trattamenti ormonali illeciti dei bovini da carne. Esso si caratterizza per l'elevata sensibilità e ripetibilità e si presta facilmente ai controlli di qualità. Lo scopo è quello di assicurare il massimo rispetto della normativa Nazionale e Comunitaria relativa all'impiego di anabolizzanti nell'allevamento del bovino da carne. Pertanto l'esame istologico può essere impiegato sia dai produttori o dagli operatori della distribuzione come forma di autocontrollo sia dal Sistema Sanitario Pubblico nell'attività di prevenzione e controllo.

Il documento che segue illustra in sintesi dapprima le caratteristiche degli anabolizzanti più utilizzati nell'allevamento bovino, il loro significato e le indicazioni dello screening, le modalità con cui può essere condotto, le tecniche di laboratorio impiegate, gli *standards* morfologici normali e patologici degli organi sottoposti a indagine istologica, i criteri per esprimere il giudizio diagnostico ed il sistema di controllo della qualità.

PREMESSA

È noto che gli anabolizzanti impiegati illegalmente in zootecnia, oltre agli effetti perseguiti, quali lo sviluppo della fibra muscolare e la diminuzione dei grassi di deposito, producono gravi alterazioni a quegli organi che in condizioni fisiologiche sono stimolati positivamente o negativamente da queste sostanze. Ciò comporta per i ricercatori un costante impegno diretto all'individuazione di parametri che consentano di riconoscere gli animali trattati, sia in vita sia dopo la macellazione. Numerosi studi sono stati condotti per determinare gli effetti di varie sostanze anabolizzanti sull'apparato genitale maschile e femminile, sulle ghiandole sessuali accessorie, sull'apparato respiratorio, sul SNC, ecc. (cfr. Bibliografia 1 - 54). Negli anni '80 si impiegavano fraudolentemente a scopo anabolizzante pochi principi attivi, spesso somministrati a dosi elevate, per cui ne conseguivano evidenti e gravi lesioni agli organi bersaglio. Successivamente si è passati all'uso di prodotti in cui figurano numerose molecole di natura completamente diversa ed in dosi assai ridotte, quali associazioni di steroidi sessuali (estrogeni, androgeni e gestageni), β_2 agonisti e cortisonici. Si verifica ad esempio che in seguito all'uso di *ormoni sessuali*, le ovaie di soggetti impuberi si attivano aumentando di volume, diventano cistiche o si atrofizzano, oppure semplicemente iniziano a ovulare come se si trattasse di soggetti adulti. L'utero mostra notevoli raccolte di muco nel lume e le ghiandole accessorie dell'apparato genitale diventano iperplastiche/

*Parte dei dati relativi agli standards normali nel vitello e nel vitellone derivano dai risultati di ricerche finanziate dalla Regione Piemonte, Assessorato alla Sanità, Direzione di Sanità Pubblica di cui alla deliberazione n. 44-4513 del 19.11.2001 e determinazione n. 337 del 27.11.2002 della Regione Piemonte.

metaplastiche o attivano le secrezioni, infine la ghiandola mammaria nei soggetti impuberi subisce un processo di sviluppo precoce. I *beta agonisti* provocano modificazioni della forma della trachea la cui componente muscolare si rilassa sino alla scomparsa della cresta tracheale e nel fegato causano deplezione di glicogeno, mentre a livello genitale le lesioni variano dall'idrometra all'atrofia a seconda della specie animale. I *cortisonici* sono responsabili di grave atrofia del timo. I *tireostatici* provocano iperplasia e struma della tiroide. L'uso di queste sostanze comporta quindi importanti conseguenze per gli animali in termini di benessere e sanità come pure per l'uomo i cui alimenti non devono contenere residui di sostanze farmacologicamente attive e potenzialmente dannose per la salute. In sintesi, il concetto di qualità totale, che tende ad armonizzare e conciliare le tecniche di allevamento volte a ricavare il massimo rendimento dalle popolazioni animali, non può prescindere dall'assoluta e irrinunciabile condizione di rispetto minimo del benessere degli animali allevati e dall'assenza di sostanze dannose per la salute dell'uomo nei prodotti derivati. Sul piano del controllo ufficiale si ricorre sistematicamente ai prelievi di tessuti e materiale biologico per le indagini chimiche quali-quantitative. Recentemente è stato rivalutato dal "Piano Nazionale Residui" predisposto dal Ministero della Sanità l'esame anatomo-istopatologico che consente rilievi di ordine qualitativo, essendo in grado di rivelare le profonde modificazioni precedentemente descritte a carico degli organi bersaglio. Si tratta di lesioni che perdurano per un tempo sufficientemente lungo da poter essere svelate al momento della macellazione. È chiaro che questo tipo di indagine assume notevole importanza nello screening favorendo l'azione di prevenzione mediante l'individuazione degli allevamenti a rischio. L'elevata sensibilità dell'esame anatomo-istopatologico è testimoniata da numerose indagini ed esperimenti condotti sia dai nostri gruppi di ricerca sia da altri (cfr. Bibliografia 1 - 54). D'altra parte le indagini chimiche quantitative, che se positive sono la chiara prova di un avvenuto trattamento, non sembrano rispecchiare sufficientemente la realtà. I motivi di queste difficoltà sono in parte riconducibili alla rapida metabolizzazione ed eliminazione cui vanno incontro alcune di queste molecole, all'uso di combinazioni di numerose molecole nello stesso preparato e in parte all'adozione di molecole diverse o comunque modificate rispetto a quelle che vengono ricercate dalle metodiche ufficiali.

Anabolizzanti

Le molecole, naturali o di sintesi, utilizzate a scopo anabolizzante appartengono principalmente alle seguenti categorie:

- ✓ *Ormoni sessuali e analoghi di sintesi*
 - **Estrogeni:** 17- estradiolo; etinilestradiolo; dietilstilbestrolo.
 - **Androgeni:** testosterone; stanozololo; metiltestosterone; trenbolone.
 - **Gestageni:** progesterone; clormadinoneacetato; medrossiprogesteroneacetato.
- ✓ *Beta-agonisti*
 - clenbuterolo; salbutamolo; mabuterolo; mapenterolo.

- ✓ *Cortisonici*
 - prednisolone; desametazone; beclometazone.
- ✓ *Tireostatici*
 - metiltiouracile; tapazolo.
- ✓ *Ormone della crescita*
 - somatotropina; somatotropina ricombinante.

Gli ormoni sessuali, i cortisonici e i beta-agonisti sono quelli più utilizzati dal mercato illegale. Spesso vengono impiegati sotto forma di associazioni quali ad es.:

- Estrogeni + Androgeni (estradiolo + testosterone).
- Estrogeni + Gestageni (estradiolo + progesterone).
- Ormoni sessuali + beta-agonisti + Corticosteroidi (*cocktails* con 5-30 componenti, estrogeni, androgeni, gestageni, beta-agonisti e corticosteroidi).

La somministrazione avviene per:

- via parenterale (iniezione)
- via transcutanea (pour-on)
- via orale
- impianto sottocutaneo

Effetti degli anabolizzanti sul bovino

Gli animali trattati con anabolizzanti vanno incontro a:

- ✓ alterazioni del comportamento;
- ✓ modificazione dei parametri zootecnici caratteristici della razza e alterazioni morfo-funzionali di alcuni organi ispezionabili alla visita clinica;
- ✓ alterazioni morfologiche e funzionali a carico di diversi organi interni.

Alterazioni del comportamento

Sintomi	Molecola responsabile
Ipereccitabilità, tremori, sudorazione	-agonisti
Aumento della libido	Androgeni, estrogeni
Ipereccitazione, aggressività	Androgeni
Sottomissione, movimenti lenti	Progestinici

Modificazione dei parametri zootecnici caratteristici della razza e alterazioni morfo-funzionali di alcuni organi ispezionabili alla visita clinica

Maschi

- muscolatura molto sviluppata;
- testicoli di dimensioni ridotte;
- ghiandola mammaria aumentata di volume;

Femmine

- muscolatura molto sviluppata, soprattutto dei quarti anteriori e del collo;
- aumento di dimensioni del clitoride;
- edema della vulva;
- ghiandola mammaria e capezzoli aumentati di volume nei soggetti impuberi;
- aumento delle secrezioni vaginali;
- inserzione "alta" della coda.

Alterazioni morfologiche a carico dei principali organi bersaglio

Effetti degli estrogeni

- ✓ Effetti sui maschi
 - *Quadro macroscopico*: testicoli ridotti in dimensione e sviluppo, aspetto biancastro della superficie di taglio della prostata, aumento di dimensioni dei capezzoli, sviluppo della ghiandola mammaria.
 - *Quadro istologico*: atrofia testicolare, iperplasia/metaplasia e fibrosi nella prostata e nelle ghiandole bulbo-uretrali, differenziazione della mammella (cfr. Bibliografia: 1, 8, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 21, 25, 26, 28, 29, 30, 35, 36, 39, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 50, 51, 52, 53, 54, 55).
- ✓ Effetti sulle femmine
 - *Quadro macroscopico*: aumento di volume dell'utero; ovaie cistiche o atrofiche; aumento di volume della ghiandola vestibolare maggiore, della ghiandola mammaria e dei capezzoli nei soggetti impuberi.
 - *Quadro istologico*: metaplasia nella cervice e iperplasia/metaplasia e fibrosi nella ghiandola vestibolare maggiore; ovaie cistiche o atrofiche; mucometra, sviluppo precoce della porzione ghiandolare secernente (differenziazione) della ghiandola mammaria nei soggetti impuberi (cfr. Bibliografia: 1, 3, 5, 6, 7, 11, 16, 18, 19, 23, 25, 26, 32, 34, 40, 42, 43, 46, 47, 51, 54, 55).

Effetti degli androgeni

- ✓ Effetti sui maschi
 - *Quadro macroscopico*: testicoli ridotti in dimensioni e sviluppo; aumento di volume delle ghiandole bulbo-uretrali.
 - *Quadro istologico*: ipersecrezione, formazione di cisti e fibrosi a livello di prostata e ghiandole bulbo-uretrali; atrofia testicolare (cfr. Bibliografia: 1, 8, 14, 16, 21, 25, 26, 28, 29, 30, 31, 37, 39, 42, 43, 47, 50, 51, 54, 55).
- ✓ Effetti sulle femmine
 - *Quadro macroscopico*: aumento di volume del clitoride.
 - *Quadro istologico*: aumento di dimensioni del clitoride e separazione del prepuzio. A livello della ghiandola vestibolare maggiore ipersecrezione, formazione di cisti e fibrosi (cfr. Bibliografia: 1, 3, 5, 6, 7, 16, 19, 23, 25, 26, 27, 32, 34, 37, 40, 42, 43, 47, 51, 54, 55).

Effetti dei tireostatici

- *Quadro macroscopico*: aumento di volume e di peso fino a tre volte della tiroide.
- *Quadro istologico*: iperplasia/struma tiroideo (cfr. Bibliografia: 22, 24, 48).

Effetti dei corticosteroidi

- *Quadro macroscopico*: riduzione del volume e del peso del timo (50-100 g, sino all'atrofia completa, contro i 400-800 g di un timo normale) e delle ghiandole surrenali.
- *Quadro istologico*: atrofia e deplezione linfocitaria del timo; involuzione adiposa e fibrosi; ipotrofia della corticale del surrene (cfr. Bibliografia: 3, 9, 33, 34, 47).

Effetti dei -agonisti

- *Quadro macroscopico*: rilassamento della muscolatura liscia tracheale con aumento del diametro trasversale dell'organo associato a scomparsa della cresta tracheale; riduzione del grasso sottocutaneo e perirenale (cfr. Bibliografia: 2, 3, 4, 6, 41).

Combinazioni di ormoni (cocktails)

- Combinazioni di effetti (gli androgeni limitano gli effetti degli estrogeni e viceversa).

Effetti tossici sugli animali

Gli anabolizzanti possono causare:

- epatotossicità;
- nefrotossicità;
- ridotta fertilità;
- aborto o mummificazione del feto nelle vacche gravide;
- infezioni dovute all'immunodepressione (mastiti, artriti, peritoniti, metriti);
- trauma a livello del punto di inoculazione della sostanza;
- cancerogenicità: dimostrata negli animali da laboratorio.

Benessere animale

Il benessere degli animali trattati è condizionato dalle patologie indotte dagli stessi anabolizzanti ed in particolare da:

- infezioni;
- patologia degli organi bersaglio (es. disendocrinie, lesioni ovariche, ecc.);
- modificazioni del comportamento.

SCREENING

Significato e indicazioni dello screening

Lo screening utilizza metodiche di indagine ad elevata sensibilità i cui esiti sono caratterizzati da pochi falsi negativi. Nel caso specifico, consente di comprendere le dimensioni e la diffusione del fenomeno legato all'uso fraudolento degli anabolizzanti.

Indagini utilizzabili per lo screening

- ✓ Esame clinico dell'animale pre-macellazione
- ✓ Esame macroscopico degli organi bersaglio
- ✓ Esame istologico degli organi bersaglio

Esame clinico pre-macellazione

Vedi: "Alterazioni del comportamento" - "Modificazione dei parametri zootecnici caratteristici della razza e alterazioni morfo-funzionali di alcuni organi ispezionabili alla visita clinica".

Esame macroscopico degli organi bersaglio

Di seguito sono elencati i principali organi che subiscono modificazioni riconducibili a trattamenti anabolizzanti e che forniscono informazioni utili nell'ambito di uno screening. In parentesi sono indicati gli anabolizzanti responsabili delle alterazioni. Per le lesioni riscontrabili mediante l'esame macroscopico vedi quanto riportato nel capitolo "Effetti degli anabolizzanti sul bovino" (paragrafo "Alterazioni morfologiche a carico dei principali organi bersaglio").

Peso del timo e della tiroide

- ✓ timo normale nel vitello: 400-800 g (<300 g: sospetto trattamento con corticosteroidi);
- ✓ tiroide normale vitello: 11-20 g (>35 g: sospetto trattamento con tireostatici);
- ✓ tiroide normale vitellone 20-40 g.

Principali organi o tessuti che possono presentare alterazioni in seguito alla somministrazione di anabolizzanti

Femmine

- ✓ tratto genitale: utero, ovaie, ghiandola vestibolare maggiore, ghiandola mammaria (ormoni sessuali);
- ✓ timo, surrene (corticosteroidi);
- ✓ tiroide (tireostatici);
- ✓ trachea (-agonisti);
- ✓ tessuto sottocutaneo (ormoni sessuali e -agonisti).

Maschi

- ✓ tratto genitale: testicoli, ghiandole bulbo-uretrali, prostata (ormoni sessuali);
- ✓ timo, surrene (corticosteroidi);
- ✓ tiroide (tireostatici);
- ✓ trachea (-agonisti);
- ✓ tessuto sottocutaneo (ormoni sessuali e -agonisti).

Esame istologico degli organi bersaglio

Di seguito sono riportati, assieme alla tipologia delle lesioni, gli organi il cui esame istologico consente di ricavare informazioni sufficienti per verificare l'impiego illecito di farmaci ad azione anabolizzante:

prostata e ghiandola bulbo-uretrale (ormoni sessuali):

- ✓ iperplasia/metaplasia;
- ✓ ipersecrezione, cisti e fibrosi;
- ✓ ispessimento e ripiegamenti dell'epitelio uretrale;

ghiandola vestibolare maggiore (ormoni sessuali):

- ✓ rapporto tessuto ghiandolare/dotti escretori alterato;
- ✓ iperplasia/metaplasia;
- ✓ ipersecrezione, cisti e fibrosi;

ghiandola mammaria (ormoni sessuali nei vitelli):

- ✓ sviluppo precoce della porzione ghiandolare secernente nei vitelli imuberi;

timo (corticosteroidi):

- ✓ atrofia della corticale e della midollare;
- ✓ sostituzione adiposa (iperplasia adipocitaria);

tiroide (tireostatici):

- ✓ iperplasia e struma.

Le risposte dello screening

L'esame clinico e quello anatomo-istopatologico forniscono informazioni utili ad individuare:

- ✓ natura delle sostanze utilizzate;
- ✓ tossicità organo-specifica;
- ✓ effetti sul benessere animale;
- ✓ rischi per il consumatore.

Possibilità applicative

Nel vitello e nel vitellone l'esame istologico degli organi bersaglio consente di stabilire con elevato grado di affidabilità:

- ✓ **l'avvenuta somministrazione di ormoni sessuali o analoghi di sintesi, cortisonici e tireostatici.**

L'esame clinico, la valutazione della carcassa e l'esame macroscopico degli organi:

- ✓ **hanno valore orientativo sia per quanto riguarda gli ormoni steroidei citati sia i beta-agonisti.**

ESAME ISTOLOGICO

Operatori

Comprendono la figura del veterinario addetto alle valutazioni macroscopiche e al prelievo degli organi al macello e quella del patologo veterinario addetto all'esame microscopico di routine oppure al controllo di qualità della diagnosi. A differenza di altre metodologie dove l'analisi è eseguita dalla macchina, il metodo istologico richiede l'impiego di patologi in grado di valutare con professionalità la struttura microscopica degli organi e stabilire l'eventuale presenza di alterazioni specifiche; il fattore umano costituisce pertanto un punto critico.

Nel disciplinare compaiono inoltre due strutture distinte:

1. **Laboratori diagnostici:** in cui si esegue la diagnostica routinaria.
2. **Laboratori di referenza:** in cui si effettuano i controlli di qualità della diagnosi, naturalmente non coincidono con i primi.

Organi sottoposti ad esame istologico

Prostata, ghiandola bulbo-uretrale, timo, tiroide	vitelli e vitelloni maschi
Ghiandola vestibolare maggiore, ghiandola mammaria, timo, tiroide	vitelle femmine
Ghiandola vestibolare maggiore, timo, tiroide	manzette (scottone: 15-18 mesi)

Standards istologici

Ghiandola vestibolare maggiore (di Bartolino), standard normale e patologico dovuto all'effetto degli ormoni sessuali

NORMALE

La ghiandola si trova sulla parete laterale esterna del vestibolo vaginale a 3-5 cm dalla vulva, parzialmente coperta dal muscolo costrittore vestibolare, ha forma globosa e un diametro di circa 2 cm. Istologicamente è una ghiandola tubulo alveolare composta a secrezione mucosa, suddivisa in lobuli da setti di connettivo denso. Presenta tre componenti principali: 1) *il parenchima funzionale*, formato da adenomeri a carattere mucoso con cel-

lule aventi nucleo alla base, rappresenta una percentuale limitata della ghiandola nelle femmine impuberi; è ben sviluppata negli animali in età pubere ed ancor maggiore nelle vacche; 2) *il tessuto stromale mio-connettivale*: tessuto di sostegno, contenente il sistema vasale emo-linfatico. Suddivide distintamente il parenchima in lobuli occupando gran parte dello spazio ghiandolare; 3) *l'epitelio dei dotti escretori*: monostratificato in sede lobulare, a più strati nei dotti intermedi, pavimentoso stratificato, simile all'epitelio di rivestimento della cavità vaginale, nel dotto principale. Quest'ultimo risulta composto da quattro strati: basale, parabasale, sino a quattro strati cellulari; intermedio e superficiale di circa otto piani cellulari. L'altezza dei diversi strati di cellule, varia in rapporto alla stimolazione ormonale oscillando da un minimo di 10 ad un massimo di 50 cellule. Modificando in tal modo anche la composizione ed il volume cellulare, che risulta minima in presenza di corpo luteo gravidico, massimo, espanso, nella fase ciclica estrogenica. Naturalmente nei soggetti impuberi la stimolazione ormonale non è contemplata. Negli acini e nei dotti delle vitelle impuberi modesto o assente è il riscontro muco-secretoivo mentre può essere presente in quantità moderata nei soggetti puberi.

Prelievo: la ghiandola si può raggiungere direttamente dall'esterno del vestibolo o dall'interno localizzando lo sbocco del dotto escretore principale sulla parete laterale vestibolare. Al fine di meglio evidenziare istologicamente il tessuto ghiandolare, deve essere prelevata la parte distale della ghiandola che si trova al polo opposto del dotto escretore principale.

PATOLOGICO

Valutazione macroscopica: negli animali trattati con ormoni sessuali la ghiandola può aumentare di volume e di consistenza. Possono essere presenti cisti visibili macroscopicamente.

Quadro istologico: iperplasia/metaplasia squamosa dell'epitelio sia ghiandolare sia tubulare, associato oppure no a quadri di ipersecrezione, rarefazione della porzione secretoria, aumento dei tubuli, ipertrofia dello stroma fibro-muscolare. L'epitelio dei dotti escretori è notevolmente ispessito e il citoplasma delle cellule degli strati più superficiali è espanso e aumentato di volume, il nucleo è picnotico. Ectasia pronunciata dei dotti, formazione di cavità cistiche e cisti intraepiteliali a livello dei dotti escretori sono le conseguenze dell'ipersecrezione che può essere o meno associata ad iperplasia.

Prostata e uretra, standard normale e patologico dovuto all'effetto degli ormoni sessuali

NORMALE

L'organo consta di due parti: una parte esterna, *corpo della prostata*, e una parte interna, *porzione disseminata*. Il corpo della prostata è costituito da due lobi appena accennati, collegati fra loro mediante un istmo connettivale ed è disposto sulla superficie dorsale dell'uretra pelvica, caudalmente alle vescicole seminali, presentandosi come un corpo piccolo e appiattito. Ha uno spessore, dorso-ventralmente, di 0,5-1,5 cm, è lungo 0,5-1 cm circa e largo 2-3

cm. La parte disseminata è ben sviluppata ed è incorporata nella parete dorsale dell'uretra per una lunghezza dai 7 ai 15 cm circa, in rapporto all'età degli animali. Questa porzione, visibile solo quando si seziona l'uretra, è avvolta a manicotto dal muscolo uretrale. Dorsalmente, il muscolo striato che forma un anello incompleto, termina in uno spesso strato fibroso.

Struttura: il corpo della prostata è avvolto da una capsula da cui deriva uno stroma abbondante e ricco di cellule muscolari lisce che si affonda verso la mucosa, formando setti anastomizzati ed incompleti. Il parenchima o *substantia glandularis* viene ad essere suddiviso dai setti in lobuli irregolari che convergono verso l'uretra. Lo stroma è qui ancora abbondante e sostiene, oltre ai vasi ed ai nervi, un insieme di ghiandole tubulo-alveolari, ogni gruppo delle quali è incentrato su un collettore che sbocca nell'uretra. Gli alveoli sono rivestiti da un epitelio di aspetto variabile che riposa su una membrana basale esile e spesso indistinta: si presenta basso e con cellule cilindriche o cubiche in certi punti, dotate di espansioni apicali che indicano una secrezione di tipo apocrino. Queste cellule, con nucleo ovoidale e basale, presentano tutte le caratteristiche di un'attività secernente nei vitelloni; mentre è per lo più assente nei vitelli. A ridosso della lamina basale è possibile riscontrare cellule basali, frammiste alle cellule prismatiche. I condotti escretori sono dapprima irregolari e provvisti di numerose dilatazioni e di diverticoli secernenti. Dotati di epitelio prismatico, confluiscono nei canalicoli prostatici, più stretti e meno irregolari, che sboccano nell'uretra modificando il loro epitelio che diventa progressivamente del tipo di transizione per unirsi a quello dell'uretra. Una lieve attività secernente con accumulo di modeste quantità di secreto nei dotti rientra nella norma.

L'uretra è rivestita da un epitelio di transizione dalla superficie liscia, formato da circa sei file di cellule sovrapposte, aventi il rapporto N/C a favore del nucleo. L'età degli animali normalmente non determina variazioni di assetto degne di nota.

Prelievo: una volta evidenziata l'uretra pelvica e la vescica urinaria, si esegue una sezione dello spessore di 1 cm trasversalmente all'uretra pelvica a 1 cm di distanza e caudalmente al corpo della prostata.

PATOLOGICO

Valutazione macroscopica: negli animali trattati la prostata può essere aumentata di volume sia a livello del corpo sia nella parte disseminata accompagnato da un aspetto biancastro dell'organo.

Quadro istologico: iperplasia/metaplasia squamosa dell'epitelio sia ghiandolare sia tubulare. L'epitelio dei dotti escretori è notevolmente ispessito e il citoplasma delle cellule degli strati più superficiali è aumentato di volume. Ipersecrezione e formazione di cisti di discrete dimensioni associate o meno alle lesioni iperplastiche.

L'epitelio uretrale è ispessito, metaplastico e forma delle pieghe, il citoplasma delle cellule degli strati più superficiali è aumentato di volume, il rapporto N/C è a favore del citoplasma. I trattamenti anabolizzanti possono determinare anche atrofia, con diminuzione delle file di cellule.

Ghiandola bulbo-uretrale, standard normale e patologico dovuto all'effetto degli ormoni sessuali

NORMALE

Omologhe delle vestibolari maggiori nella femmina, di forma globosa lievemente allungata, sono disposte sulla superficie dorsale dell'uretra, una a destra ed una a sinistra, poco prima che questa esca dalla cavità pelvica, a livello dell'arcata ischiatica e sono in stretto rapporto con il bulbo del pene. Alloggiano in uno spazio virtuale tra il muscolo bulbo-spongioso ed il muscolo uretrale. Le dimensioni variano da 0,5-1 cm nei vitelli a 2-3 cm nei soggetti puberi. Le due ghiandole possiedono ognuna un dotto escretore che sbocca nella parete dorsale dell'uretra.

Struttura: possiedono una capsula di rivestimento e uno stroma denso, ricco di cellule muscolari lisce e di fibre striate, che racchiude lobuli ghiandolari agglomerati. Il connettivo interlobulare presenta abbondante muscolatura liscia. Ciascun agglomerato è composto da ghiandole tubulo-alveolari/acinose, a carattere mucoso, con al centro un dotto escretore che termina in uno o più dotti collettori aventi lo stesso epitelio dei dotti ghiandolari. L'epitelio di rivestimento degli adenomeri mostra aspetto variabile a seconda della zona e dello stadio funzionale: *nel vitello* dove si trova in condizioni di riposo, è cubico o prismatico semplice con cellule a citoplasma ricco di granuli di secreto, molti dei quali di tipo mucoso, e nucleo chiaro e sferico; *nei soggetti puberi* le cellule secernenti appaiono cilindriche o piramidali con citoplasma basofilo, colme di muco, con nucleo appiattito contro la membrana basale. Talvolta si riscontrano cellule basali. La composizione acinosa a carattere mucoso nei bovini adulti risulta determinante per tutto lo spessore ghiandolare, mentre nei vitelli il tessuto è decisamente immaturo. I condotti escretori sono rivestiti da un epitelio batiprismatico semplice e confluiscono a formare dei condotti intra-ghiandolari più grandi, rivestiti da epitelio pseudostratificato che assume caratteri di transizione vicino alla terminazione. Questi confluiscono poi in un condotto unico, provvisto di epitelio di transizione, che si apre sul margine della valvola dell'istmo dell'uretra.

Prelievo: dopo aver prelevato la prostata, si localizzano le ghiandole bulbo-uretrali nella porzione caudale dell'uretra sotto al muscolo bulbo-spongioso e si preleva un campione delle dimensioni di 1×1×2 cm.

PATOLOGICO

Iperplasia/metaplasia squamosa dell'epitelio alveolare e dei dotti escretori, ipersecrezione, formazione di cisti, iperplasia fibro-muscolare. Lesioni iperplastiche e ipersecretive possono essere presenti sia singolarmente sia associate.

Ghiandola mammaria, standard normale e patologico nella vitella impubere dovuto all'effetto degli ormoni sessuali

NORMALE

Fino alla pubertà la ghiandola mammaria mantiene inalterata la morfologia mentre, con l'avvio del ciclo sessuale inizia lo sviluppo della porzione secernente e, con l'allatta-

mento conseguente al parto, vengono raggiunti il pieno sviluppo e la piena funzionalità. Strutturalmente nella bovina consiste di due complessi a destra e due a sinistra della linea mediana. Ogni complesso mammario è costituito da due parti: il *corpo ghiandolare* semisferico e il *capezzolo*. Il corpo ghiandolare è formato dal parenchima ghiandolare e dal tessuto connettivo interparenchimatoso dei dotti ed è rivestito dalla cute. Il sistema cavitario è composto da tre segmenti: il dotto papillare, il seno galattoforo e i dotti lattiferi. Questi ultimi si spingono in profondità nel parenchima, ramificandosi sempre di più in dotti escretori, rivestiti da epitelio monostratificato, esaurendosi nei segmenti ghiandolari terminali a struttura alveolare e secernenti il latte.

La ghiandola mammaria risulta così essere una ghiandola tubulo-alveolare. Il quadro istologico presenta nella vitella i dotti escretori ramificati rivestiti da epitelio monostratificato immersi in tessuto connettivo lasso e tessuto adiposo, circondati inoltre da cellule mioepiteliali, cellule muscolari lisce e fibre elastiche. Nel soggetto impubere sono completamente assenti alveoli secernenti.

Prelievo: occorre prestare molta attenzione poiché nella vitella il parenchima è ristretto a pochi cm di tessuto di colore rosa pallido localizzato alla base del capezzolo dal quale si preleva un cubetto delle dimensioni di 1×1×1 cm.

PATOLOGICO

Valutazione macroscopica: negli animali trattati con estrogeni/progesterone la ghiandola mammaria è aumentata di volume e i capezzoli possono essere allungati e lasciar fuoriuscire secreto.

Quadro istologico: presenza più o meno pronunciata di tessuto ghiandolare differenziato attorno ai dotti e negli spazi prima occupati dal tessuto adiposo. Il tessuto differenziato è costituito da alveoli ghiandolari ripieni di secreto che si sviluppano progressivamente in senso centrifugo a partire dalla periferia dei dotti.

Timo, standard normale e patologico dovuto all'effetto dei cortisonici

NORMALE

Il timo del bovino consta di una parte toracica e una parte cervicale. La *parte toracica*, impari, è posta nella metà dorsale del mediastino precordiale, asimmetricamente a sinistra. Dorsalmente viene delimitato dalla colonna vertebrale e dal tratto toracico del muscolo lungo del collo, caudalmente dal pericardio, centralmente dal tronco brachiocefalico e dalle sue diramazioni nonché dalla vena cava craniale e dal lobo apicale del polmone destro. La sua faccia destra è in rapporto con la trachea e con l'esofago. La sua faccia sinistra è in parte rivestita dalla pleura. Il timo toracico è connesso al tratto cervicale, impari, tramite l'istmo cervicotoracico, anch'esso impari, che va a costituire un ponte parenchimatoso che decorre a sinistra della trachea.

Nella *parte cervicale* del timo si distinguono un tratto caudale impari (corpo) e due branche pari poste cranialmente. Così il tratto cervicale del timo assume all'incirca la forma di una "V" con l'apice rivolto verso il torace. Esso

costituisce la parte più imponente dell'organo. Il corpo del timo cervicale giace dorsalmente alla trachea e viene affiancato dalle due vene giugulari. Le branche si dispongono lateralmente alla trachea e raggiungono cranialmente la ghiandola tiroide. Il tratto cervicale del timo è ricoperto lateralmente e centralmente dal muscolo sternocleidomastoideo e dai muscoli ioidei inferiori.

Istologicamente il timo presenta una struttura lobulare. I lobuli sono costituiti da una corticale più scura, e una midollare, più chiara, per la presenza di linfociti in quantità maggiore nella prima e più diradati nella seconda. Sono inoltre separati da sepimenti di connettivo lasso derivanti dalla capsula che riveste l'organo e che si approfondano sino alla midollare. Scarsamente evidenti, frammiste ai linfociti vi sono le cellule epitelioreticolari, esse rivestono la periferia dell'organo, i vasi e formano un cito-reticolo di supporto alla massa di linfociti timici. Nella midollare sono presenti i corpuscoli di Hassall, del diametro di 20-100 µm formati da lamine concentriche di cellule reticolari epiteliali in vari stadi di degenerazione. Nella corticale si notano sparsi fenomeni apoptotici a carico dei timociti che vengono inglobati dai macrofagi (tingible body macrophages). Nei vitelli la corticale può presentare alla periferia piccole aree o strati sottili di tessuto adiposo ma rimane comunque sempre chiaramente evidenziabile e supera quantitativamente la midollare. Nei vitelloni questo fenomeno è più marcato ed i parametri relativi all'involuzione timica sono in via di standardizzazione.

Prelievo: è sufficiente prelevare un frammento, 1×1×2 cm, dal timo toracico chiaramente evidenziabile sulla porzione craniale del mediastino davanti al cuore.

PATOLOGICO

Valutazione macroscopica: gli animali trattati con corticosteroidi evidenziano riduzione di volume dell'organo sino alla sua scomparsa.

Quadro istologico: i cortisonici causano la scomparsa dei timociti. Il timo va incontro ad atrofia e il tessuto ghiandolare è sostituito da tessuto adiposo. Tale fenomeno è più evidente a livello della corticale la quale si assottiglia progressivamente a partire dalla periferia sino alla midollare. Nei casi più gravi il timo non è più riconoscibile ed è trasformato in una massa di tessuto adiposo che ingloba sparsi cumuli di cellule linfocitarie.

Tiroide, standard normale e patologico dovuto all'effetto dei tireostatici

NORMALE

La tiroide è localizzata anteriormente alla trachea, caudalmente alla laringe. Essa risulta costituita da due lobi addossati alle superfici laterali della trachea, e di una parte mediana o *istmo*, che aderisce alla faccia ventrale della trachea. I due lobi laterali, dei quali il sinistro è generalmente più sviluppato, sono appiattiti, consistenti al tatto e a contorno irregolarmente triangolare o quadrangolare. L'istmo unisce tra loro i due lobi e risulta formato per lo più da un cordone trasversale di tessuto ghiandolare, largo 1-1,5 cm, applicato al secondo anello tracheale. Istologicamente possiede un parenchima costituito da follicoli più o meno sferici,

delimitati da un epitelio semplice, piatto o cubico. Le cavità dei follicoli sono ripiene di sostanza colloide, eosinofila, nella quale è contenuto il secreto ghiandolare. Il volume ed il peso della tiroide variano considerevolmente da soggetto a soggetto e secondo la razza, l'età ed il sesso, ed anche con il variare delle condizioni climatiche e stagionali. Nel vitello ha un colore che varia dal bruno-grigiastro al bruno-scuro, mentre nell'adulto è di color bruno-rossastro chiaro. La circolare 29.09.00, n. 14 (GU 268, 16.11.2000) identifica il peso normale della tiroide nel vitello tra gli 11 e i 14 grammi.

Prelievo: la tiroide è addossata ai primi anelli tracheali, i lobi sono disposti in posizione laterale e sono uniti dall'istmo costituito da tessuto ghiandolare e connettivo. Il prelievo si esegue asportando un lobo della ghiandola.

PATOLOGICO

Valutazione macroscopica: nei soggetti trattati con tireostatici le alterazioni macroscopiche sono rappresentate da un semplice aumento di volume e di peso dell'organo.

Quadro istologico: le alterazioni istopatologiche dell'epitelio sono di tipo iperplastico caratterizzate da proliferazione dell'epitelio follicolare con formazioni di aspetto papillare o a cuscinetto associate a deplezione della sostanza colloide, sino alla proliferazione pluristratificata che, nei casi più gravi, determina la scomparsa del lume follicolare. L'aspetto generale dell'alterazione può essere quindi riferito ad uno "struma iperplastico" che può aggravarsi sino allo "struma parenchimoso" in cui il tessuto ghiandolare assume un aspetto compatto.

Scheda prelievo campioni

Protocollo per l'esame anatomo-patologico alla macellazione di vitelli, vitelloni e scottoni e per il prelievo dei campioni per l'esame istologico (vedi Scheda nella pagina seguente).

Processazione dei campioni

I campioni possono essere processati indifferentemente in due modi:

- 1) **preparati al criostato:** sono destinati alla processazione immediata o in tempi brevi;
- 2) **preparati fissati in formalina e inclusi in paraffina:** possono essere processati a partire da 24 ore dal prelievo, oppure possono essere conservati per un periodo illimitato nella soluzione fissativa.

1) Procedura per allestire i preparati al criostato

- Regolare la temperatura del criostato a -20°C;
- inserire la lama nel criostato per il tempo necessario affinché possa raggiungere la stessa temperatura del criostato;
 - selezionare porzioni di tessuto dello spessore di 3-5 mm, non più larghi del supporto porta tessuto;
 - rimuovere tutto il tessuto adiposo del preparato in esame;
 - ridurre il campione per ottenere una superficie piana da adattare al supporto;

SCHEDA PRELIEVO CAMPIONI

Data N° maschio femmina Età (mesi) Razza

Laboratorio analisi N. prot.

ESAME MACROSCOPICO

Trachea: verificare la presenza o meno della cresta tracheale, dovuta al rilassamento della muscolatura liscia.

Utero: verificare il contenuto mediante un taglio longitudinale delle corna uterine (possibile presenza di idrometra o di mucometra).

Ovaie: verificare, mediante un taglio longitudinale, la presenza di formazioni cistiche (cisti follicoliniche, ovaie microcistiche, ovaie policistiche) in soggetti impuberi. Verificare l'eventuale presenza di neoplasie (masserelle nodulari solide o cistiche, situate in profondità, grigio-biancastre, 0,5-3,5 cm, visibili solo al taglio).

Prostata e gh. bulbo-uretrale: valutare un'eventuale ipertrofia.

Ghiandola mammaria: valutare un'eventuale ipertrofia in soggetti impuberi e la configurazione dei capezzoli.

Ghiandola vestibolare maggiore (di Bartolino): valutare un'eventuale ipertrofia.

Timo: verificarne lo sviluppo; in caso di atrofia apparente già all'esame ispettivo, sottoporlo a pesatura.

Tiroidi: verificare un eventuale aumento di volume e di peso.

INDICARE NELLA TABELLA LE LESIONI RICONTRATE E I PRELIEVI ESEGUITI

Organo	Lesione macroscopica		
TRACHEA	Assenza della cresta		
UTERO	Idrometra		
	Mucometra		
OVAIE	Presenza di	Macrocisti	
		Microcisti	
	Attive in soggetto impubere		
	Atrofiche		
	Con sospetta neoplasia		
PROSTATA	Ipertrofia		<u>Prelievo per l'esame istologico</u> (segnalare con una croce l'avvenuto prelievo)
BULBO-URETRALE	Ipertrofia		
GH. BARTOLINO	Ipertrofia/cisti		
GHIANDOLA MAMMARIA	Ipertrofia in soggetto impubere		
TIMO	Atrofico		
	Peso		
TIROIDI	Ipertrofia		

• Prelievi destinati al criostato

Sono previste 2 modalità: 1) immergere e conservare il campione in azoto liquido, se necessario trasferire in un secondo tempo il campione in un frigorifero a -80 °C previa immersione in criocconservante (OCT). - 2) conservare il campione in un contenitore refrigerato a -4 °C e trasportarlo nel più breve tempo possibile al laboratorio di analisi (max 2 - 3 ore).

• Prelievi destinati all'istologia classica

Immergere il campione in formalina al 4% tamponata e conservarlo per almeno 24 ore prima della processazione. Il rapporto volumetrico massa solido/liquido deve essere almeno 1/6.

Note

- per un rapido congelamento può essere utilizzata la seguente tecnica: aggiungere 10-15 gocce di criobloccante sul supporto porta oggetto;
- appoggiare il tessuto sul supporto porta oggetto;
- inserire il supporto porta oggetto con relativo tessuto nella zona del criostato a rapido surgelamento;
- adattare la lama fredda con il giusto angolo di taglio;
- inserire il supporto nella sua apposita morsa o alloggiamento;
- ruotare il campione affinché l'asse maggiore abbia la giusta angolatura rispetto alla lama;
- sezionare il tessuto allo spessore di 30 μ affinché l'intera superficie venga interessata dal taglio;
- quando il tessuto è sezionato, posizionare la lama in corrispondenza di una zona non utilizzata;
- regolare lo spessore a 5 μ ;
- pulire la lama regolarmente con carta o pennello (mantenuti alla temperatura del criostato);
- utilizzare il pennello per impedire che la sezione si arrotoli sulla lama o usare il dispositivo anti-arrotolamento per stendere la sezione;
- disporre diversi vetrini numerati a temperatura ambiente e appoggiare parallelamente sulla sezione posta sopra la lama, in tale maniera la sezione aderisce al vetrino ed è pronta per la colorazione oppure può essere mantenuta a -20°C .

Colorazione ematossilina eosina

- porre i vetrini nella soluzione di ematossilina per 3';
- lavare in acqua corrente per 5';
- immergere nella soluzione di eosina per 5';
- immergere nell'alcool 70% per 5';
- immergere nell'alcool 96% per 5';
- immergere nell'alcool 100% per 5';
- immergere nell'alcool 100% per 1';
- immergere in xilolo per 5';
- immergere in xilolo per 5'.

Coprioggetto e asciugatura

Esame del preparato: lettura al microscopio ottico.

2) Procedura per l'inclusione in paraffina

Il materiale biotipico dopo fissazione per 24 ore in formaldeide al 4% tamponata, viene lavato in acqua corrente per circa 10'.

DISIDRATAZIONE

- 1,1/2 h in alcool 80%;
- 1 h in alcool 95%;
- 1 h in alcool 95%;
- 1 h in alcool 100%;
- 1 h in alcool 100%;
- 1,1/2 h in alcool 100%;

CHIARIFICAZIONE

- 1 h in xilolo;
- 1 h in xilolo;
- 1,1/2 h in xilolo;

IMPREGNAZIONE

- 2 h in paraffina con punto di fusione 56-57°C;
- 2 h in paraffina con punto di fusione 56-57°C;
- 2 h in paraffina con punto di fusione 56-57°C;

- includere in paraffina negli appositi contenitori;
- lasciare raffreddare;
- tagliare al microtomo sezioni di 4-5 μ ;
- lasciare asciugare.

Colorazione;

*coprioggetto e asciugatura;
esame del preparato.*

Espressione del giudizio diagnostico

Schede diagnostiche

Le schede saranno compilate dai patologi veterinari che operano nei laboratori diagnostici. I dati relativi all'esame macroscopico avranno valore puramente epidemiologico, mentre gli esiti dell'esame istologico avranno valore determinante per il giudizio finale (vedi Schede pagina seguente).

Le schede sono organizzate in modo da facilitare e standardizzare anche la formulazione del giudizio, infatti il quadro rilevato dal patologo viene inserito in caselle che automaticamente portano al referto finale.

Controllo di qualità della diagnosi istologica

Il programma di controllo della qualità comporta:

- ogni 3 mesi ciascun laboratorio periferico deve inviare al laboratorio di riferimento 10 preparati istologici scelti a "random" dal laboratorio referente tra quelli delle ultime 12 settimane accompagnati dal referto diagnostico;
- le sezioni vengono valutate per la qualità dell'allestimento, della colorazione e del giudizio diagnostico emesso;
- se il giudizio diagnostico non concorda con quello del referente e/o la qualità dei preparati non è soddisfacente, il laboratorio periferico dovrà inviare 10 preparati istologici ogni mese sino alla normalizzazione;
- quando i laboratori periferici hanno problemi nel giudizio diagnostico possono richiedere la consulenza dei laboratori di riferimento per un parere tecnico di conferma o meno;
- un "ringtest" viene eseguito ogni anno, esso consiste nell'invio ai laboratori periferici di preparati di origine conosciuta (4 preparati, 2 maschi, 2 femmine, 2 positivi, 2 negativi);
- una volta all'anno si tiene un seminario cui partecipano tutti gli operatori coinvolti nella lettura dei preparati. Nel seminario vengono discussi i risultati delle letture di controllo dei campioni inviati ogni 3 mesi e gli operatori vengono aggiornati sui risultati delle ricerche sperimentali disponibili;
- ogni laboratorio riceve e conserva una raccolta di immagini istologiche di organi provenienti da animali positivi e negativi;
- almeno una volta all'anno ogni laboratorio periferico è visitato da un referente che valuta e discute la situazione tecnico-operativa nel suo insieme.

I laboratori di riferimento provvedono sia ad istruire personale tecnico per l'allestimento dei preparati, sia a formare patologi veterinari per l'interpretazione dei preparati e la formulazione del diagnostico istopatologico.

SCHEDE DIAGNOSTICHE

PROSTATA

Numero:

Qualità del preparato buona sufficiente insufficiente
 Qualità della colorazione buona sufficiente insufficiente

Es. Macroscopico normale umentata di volume

Es. Istologico

Uretra normale metaplasia

Tessuto ghiandolare prostatico

Iperplasia assente localizzata diffusa
 Metaplasia assente localizzata diffusa
 Ipersecrezione assente localizzata diffusa
 Formazione di cisti assente localizzata diffusa

Giudizio negativo sospetto positivo

Data,

L'Analista

GHIANOLA BULBO-URETRALE

Numero:

Qualità del preparato buona sufficiente insufficiente
 Qualità della colorazione buona sufficiente insufficiente

Es. Macroscopico normale umentata di volume

Es. Istologico

Iperplasia assente localizzata diffusa
 Metaplasia assente localizzata diffusa
 Ipersecrezione assente localizzata diffusa
 Formazione di cisti assente localizzata diffusa

Giudizio negativo sospetto positivo

Data,

L'Analista

GHIANOLA VESTIBOLARE MAGGIORE (DI BARTOLINO)

Numero:

Qualità del preparato buona sufficiente insufficiente
 Qualità della colorazione buona sufficiente insufficiente

Es. Macroscopico normale umentata di volume cistica

Es. Istologico

Iperplasia assente localizzata diffusa
 Metaplasia assente localizzata diffusa
 Ipersecrezione assente localizzata diffusa
 Formazione di cisti assente localizzata diffusa

Giudizio negativo sospetto positivo

Data,

L'Analista

GHIANOLA MAMMARIA NEL VITELLO IMPUBERE

Numero:

Qualità del preparato buona sufficiente insufficiente
 Qualità della colorazione buona sufficiente insufficiente

Es. Macroscopico normale umentata di volume secernente

Es. Istologico

Alveoli secernenti assenti localizzati diffusi

Giudizio negativo sospetto positivo

Data,

L'Analista

TIMO (I DATI SI RIFERISCONO AL VITELLO A CARNE BIANCA)

Numero:

Qualità del preparato buona sufficiente insufficiente
 Qualità della colorazione buona sufficiente insufficiente

Es. Macroscopico normale diminuito di volume

Es. Istologico

Infiltrazione di tessuto:
 Adiposo assente localizzata diffusa
 Atrofia della corticale assente localizzata diffusa
 Starry sky assente localizzata diffusa

Giudizio negativo sospetto positivo

Data,

L'Analista

TIROIDE

Numero:

Peso:

Qualità del preparato buona sufficiente insufficiente
 Qualità della colorazione buona sufficiente insufficiente

Es. Macroscopico normale umentata di volume

Es. Istologico

Tessuto ghiandolare:
 Iperplasia assente localizzata diffusa
 Atrofia follicolare assente localizzata diffusa

Giudizio negativo sospetto positivo

Data,

L'Analista

Bibliografia

1. Bartsh W. et al.; 1993. Anabolic steroids: action on cellular level. *Wien Med Wochenschr*; 143(14-15):363-6.
2. Biolatti B., Bollo E., Appino S., Amedeo S., Guarda F., Tartari E., Benatti G.; 1992. Somministrazione cronica di clenbuterolo in vitelli a carne bianca. Aspetti anatomico-patologici. *Atti della Società Italiana di Buiatria*, vol. XXIV; pp. 319-325.
3. Biolatti B., Bollo E., Appino S.; 1993. Patologia dell'apparato genitale, apparato respiratorio, mammella e timo di vitelli trattati con clenbuterolo e steroidi sessuali. *Argomenti di Patologia Veterinaria (Scritti in memoria del Prof. L. Leinati)*; pp. 285-302.
4. Biolatti B., Bollo E., Re G., Appino S., Tartari E., Benatti G., Elliott C.T., McCaughey W.J.; 1994. Pathology and residues of clenbuterol in experimentally treated veal calves. *Res. Vet. Sci.*; 57:365-371.
5. Biolatti B., Donn A., Bollo E., Brusa F., Negro M.; 1994. Pathologic effects following the use of anabolics in veal calves: an update. *Proceedings 18th World Buiatric Congress.*; vol. 2.
6. Biolatti B. et al.; 1994. Pathology due to anabolic agents in veal heifers. *Medicina Veterinaria*; 11(4):241-246, 248.
7. Biolatti B., Castagnaro M., Orlandi M., Ratto A., Ercolini C., Schiffer I., Bollo E., Donn A.; 1996. High prevalence of granulosa cell tumors in ovaries of regularly slaughtered calves. *E.J.V.P.*; 2(3):109-114.
8. Burg C. et al.; 1989. Morphology of the bulbo-urethral gland in calves - changes due to treatment with anabolic substances (oestradiol, testosterone and trenbolone acetate).
9. Canese M.G., Guarda F., Pancani I., Leonardo E., Bianco S.; 1985. Involuzione timica nel vitello indotta da desametasone. *Summa*; 2(4):275-280.
10. Corradi A., Cabassi E., Cantoni A.M., Di Lecce R., Borghetti P., Perillo A.; 1994. L'applicazione delle lectine nello studio delle ghiandole anesse all'apparato genitale di vitelli trattati con vari promotori di crescita. *Argomenti di Patologia Veterinaria (Scritti in memoria del Prof. L. Leinati)*; pp. 303-317.
11. Deschamps J.C., Ott R.S., Weston P.G., Shanks R.D., Kesler D.J., Bolt D.J., Hixon J.E.; 1987. Effects of zeranol on reproduction in beef bulls: Luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, and testosterone secretion in response to gonadotropine-releasing hormone and human chorionic gonadotropine. *Am. J. Vet. Res.*; 48(1):31-36.
12. Deschamps J.C., Ott R.S., McEntee K., Heath E.H., Heinrichs R.R., Shanks R.D., Hixon J.E.; 1987. Effects of zeranol on reproduction in beef bulls: scrotal circumference, serving ability, semen characteristics, and pathologic changes of the reproductive organs. *Am. J. Vet. Res.*; 48(1):137-147.
13. Deschamps J.C. et al.; 1984. Effects of zeranol on some reproductive traits in beef bulls. *Dissertation Abstract International*, B: 45(1):87-88.
14. Duffour C. et al.; 1990. Evolution des images histologiques de la prostate consécutives à l'utilisation de nouvelles molécules dans l'élevage du veau: *Revue de Médecine Vétérinaire*; 141(3):187-194.
15. Fernandez P. et al.; 1999. Detection of illegal estrogen administration through immunohistochemical markers in the bovine prostate. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*; 19(3-4):133-138.
16. Finazzi M. et al.; 1993. Reperti istologici ed immunostochimici delle ghiandole anesse all'apparato genitale in vitelli trattati con promotori di crescita. *Argomenti di Patologia Veterinaria*; pp. 273-283.
17. Floyd J.G., Ott R.S., Hixon J.E., Veeramachaneni D.N., Willms C.L., Parrett D.F.; 1994. Effects of zeranol implanted during a postweaning weight gain test on testicular semen and endocrine characteristics of bulls. *Am. J. Vet. Res.*; 55(4):556-560.
18. Fosgate O.T. et al.; 1976. Effect of diethylstilbestrol and 17-alpha-hydroxyprogesterone-n-caproate (Delalutin) on skeletal and mammary gland growth of prepubertal heifers. *Journal of Dairy Science*; 59(1):17-18.
19. Girardi C. et al.; 1990. Stato recettoriale e reperti anatomico ed istopatologici del tratto genitale femminile in vitelli a carne bianca. *Atti della Società Italiana di Buiatria*, Vol. XXII, pp. 357-367.
20. Godfrey R.W., Randel R.D., Rouquette Jr. F.M.; 1989. Effect of zeranol on sexual development of crossbred bulls. *J. Anim. Sci.*; 67:1751-1756.
21. Grandmontagne C.; 1986. Modifications histologiques de la prostate du veau traité par les différents anabolisants utilisés en élevage. *Revue de Médecine Vétérinaire*; 137(1):37-47.
22. Griem W. et al.; 1973. Histological changes in the thyroid glands of cattle and rabbits after feeding methylthiouracil. *Berl. Munch. Tier. Wochenschr*; 86:50-56.
23. Groot M., Den Hartog J.M.P.; 1990. Histological changes in the genital tract of female veal calves implanted with naturally occurring anabolic steroids. *Journal of Veterinary Medicine. Series A.*; 37(10):775-786.
24. Groot M., Schilt R., Ossenkoppelle J.S., Berende L.M., Haasnoot W.; 1998. Combinations of growth promoters in veal calves: consequences for screening and confirmation methods. *Journal of Veterinary Medicine. Series A.*; 45:425-440.
25. Groot M. et al.; 1989. Histologic hormone studies, a practical evaluation. *The Veterinary Quarterly*; 11(01):1-11.
26. Groot M. et al.; 1989. Histological examination for detecting hormone use, a trial on veal calves. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde*; 114(6):315-321.
27. Groot M. et al.; 1989. Influence of androgens on the genital tract of cyclic heifers. *The Veterinary Quarterly*; 11:198-209.
28. Groot M. et al.; 1990. Histological changes in the prostate of veal calves after the administration of natural hormones. *Arch. Lebensmittelhyg*; 41:37-42.
29. Groot M. et al.; 1992. Histological screening for illegal growth promoting agents in veal calves. Ph.D. Thesis Utrecht.
30. Groot M. et al.; 1992. Influence of clenbuterol alone and in combination with natural hormones, on prostate histology in male goat kids. *Arch. Lebensmittelhyg*; 43:110-114.
31. Groot M. et al.; 2000. Changes in cytokeratine expression in accessory sex glands of growth promoter treated veal calves: influences of treatment schedule and combination of drugs. *European Journal of Veterinary Pathology*; 6(1):19-24.
32. Gropp J. et al.; 1976. Effect of 17-beta-oestradiol and trenbolone acetate in different doses on several physiological and morphological parameters (provocation trial). *Fortschritte in der Tierphysiologie und Tierernahrung*; 6:33-52.
33. Guarda F., Valenza F., Biolatti B., Quaglia F., Emanuel C.; 1984. Sull'atrofia precoce del timo in seguito a somministrazione prolungata di glicocorticoidi nei vitelli sanati. *Il nuovo progresso veterinario*, n°9.
34. Guarda F., Biolatti B., Valenza F., Miglietti M.; 1990. Correlazioni anatomico-patologiche tra lesioni del timo e dell'apparato genitale femminile di vitelli a carne bianca regolarmente macellati. *Dtsch. tierarztl. Wschr.*; 79:313-315.
35. Jansen E.H., Stepany R.W., Vos J.G., Ruitenberg E.J., Benraad Th.J., De Boer F., De Ruij W.G., Weijman J., Schmidt N.A.; 1989. Application of diethylstilbestrol dipropionate in bulls. Excretion of residues in urine and faeces and histological and immunohistochemical changes in the prostate. *The Veterinary Quarterly*; 11(1):1-11.
36. Kroes R., Berkvens J.M., Loendersloot H.J., Ruitenberg E.J.; 1971. Oestrogen-induced changes in the genital tract of the male calf. *Zbl. Vet. Med., Reihe A*; 18:717-730.
37. Little W., Kay R.M., Harwood D.J., Heitzman; 1979. The effect of implanting prepuberal dairy heifers with anabolic steroids on live-weight gain, blood and urine composition and milk yield. *J. Agric. Sci., Camb.*; 93:321-327.
38. Lommen A. et al.; 1993. Combining two independent screening methods as a new possibility for screening the illegal use of growth promotants. *Journal of Veterinary Medicine. Series A.*; 40:271-282.
39. Luppi A. et al.; 1988. Istopatologie ghiandolari di bovini sottoposti, per fine zoeconomico, a trattamenti con sostanze ad azione ormonale ed antiormonale. *Rivista della Società Italiana di Scienza dell'Alimentazione*; 17(6):499-510.
40. Moran C. et al.; 1989. The effect of chronic exposure to androgens and oestrogens on development of mammary glands and reproductive tracts in heifers. *Irish Journal of Agricultural Research*; 28(1):73-78.
41. Palliola E. et al.; 1989. L'impiego del clenbuterolo cloridrato nell'ingrasso di bovini con età inferiore a dodici mesi. Nota I: Rilievi macroscopici e microscopici al macello. *Rivista della Società Italiana dell'Alimentazione*. 18(2):89-94.
42. Palliola E. et al.; 1990. Ghiandole ormono dipendenti: quadri istopatologici conseguenti a somministrazione di sostanze ad azione anabolizzante e beta-agoniste. *Rivista della Società Italiana di Scienza dell'Alimentazione*. 19(1-2):55-65.
43. Rosmini R. et al.; 1987. Interpretation of histological findings in the prostate and Bartholin's glands of slaughter calves. *Praxis Veterinaria, Italy*; 8(3):8-10.
44. Ruitenberg E.J., Kroes R., Berkvens J.; 1970. Evaluation of the "prostate test" in checking the administration of oestrogens in the calf. *Zbl. Vet. Med., Reihe A*; 17(4):351-7.
45. Ruitenberg E.J. Et al.; 1967. Recherches histologiques sur la prostate comme moyen de controle de l'administration d'oestrogènes chez le veau. *Bull. Off. Int. Epiz.*; 68:759-767.
46. Schaudinn B. et al.; 1977. Detecting the use of oestrogens in calves by histological means. *Fleishwirtschaft*; 57(9):1664-1668.
47. Schilt R., Groot M.J., Berende P.L.M., Ramazza V., Ossenkoppelle J.S., Haasnoot W., Van Bennekom O., Brouwer L., Hooijerink H.; 1998. Pour on application of growth promoters in veal calves: analytical and histological results. *Analyst*; 123(12):2665-2670.
48. Seren E., Mora A.; 1973. Funzionalità tiroidea di bovini normali e trattati con metiltiouracile (possibilità di riconoscere in vivo gli animali trattati con antitiroidei). *Folia Vet. Lat.*; 3(1):52-73.
49. Severini M. et al.; 1990. Mappe territoriali di rischio. Risultati di un'esperienza condotta per valutare la distribuzione nel territorio di bovini trattati con sostanze ormonali. *Obiettivi e Documenti Veterinari*; 11:41-45.
50. Silcox R.W., Silcox R.W., Keeton J.T., Johnson B.H.; 1986. Effects of zeranol and trenbolone acetate on testis function, live weight gain and carcass traits of bulls. *J. Anim. Sci.*; 63:358-368.
51. Trevisani M. et al.; 1990. Prevalenza di modificazioni istologiche in prostate e ghiandole di Bartolino prelevate da bovini regolarmente macellati. *Atti della Società Italiana di Scienze Veterinarie*; 44:593-596.
52. Weijman J., Zwart P., Vos J.G., Ramaekers F.C.S.; 1996. Immunohistochemical method for detecting lesions in the prostate gland of bulls treated with diethylstilbestrol-dipropionate. *Veterinary Record*; 139(21):515-519.
53. Weijman J. et al.; 1987. Immunohistochemistry of cytokeratins in prostate tissue as a possible sensitive method for screening of veal calves treated with anabolic estrogens. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde*; 112(9):507-13.
54. Yuasa H., Fukabori Y., Mashimo T., Ohma C., Suzuki T., Yamanaka H., Suzuki K.; 1993. The characteristics of hormone responsiveness of glandular epithelium and stroma in male accessory sex organs. *Hinyokika kyo*; 39(7):631-637.
55. Zottola T. et al.; 1991. Histological studies on the prostate and Bartholin's glands of calves slaughtered in the Lazio region. *Atti della Società Italiana di Buiatria*; 23:341-346.