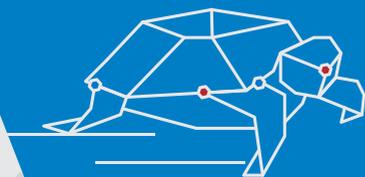


**MYLAV<sup>®</sup>**

Laboratorio La Vallonea

Il laboratorio dei **clinici** per i **clinici**

Tratto dal Blog **MYLAV**

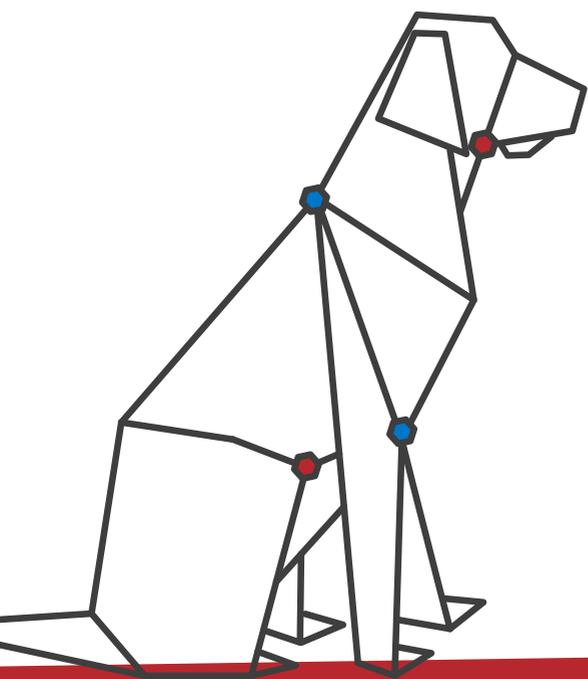


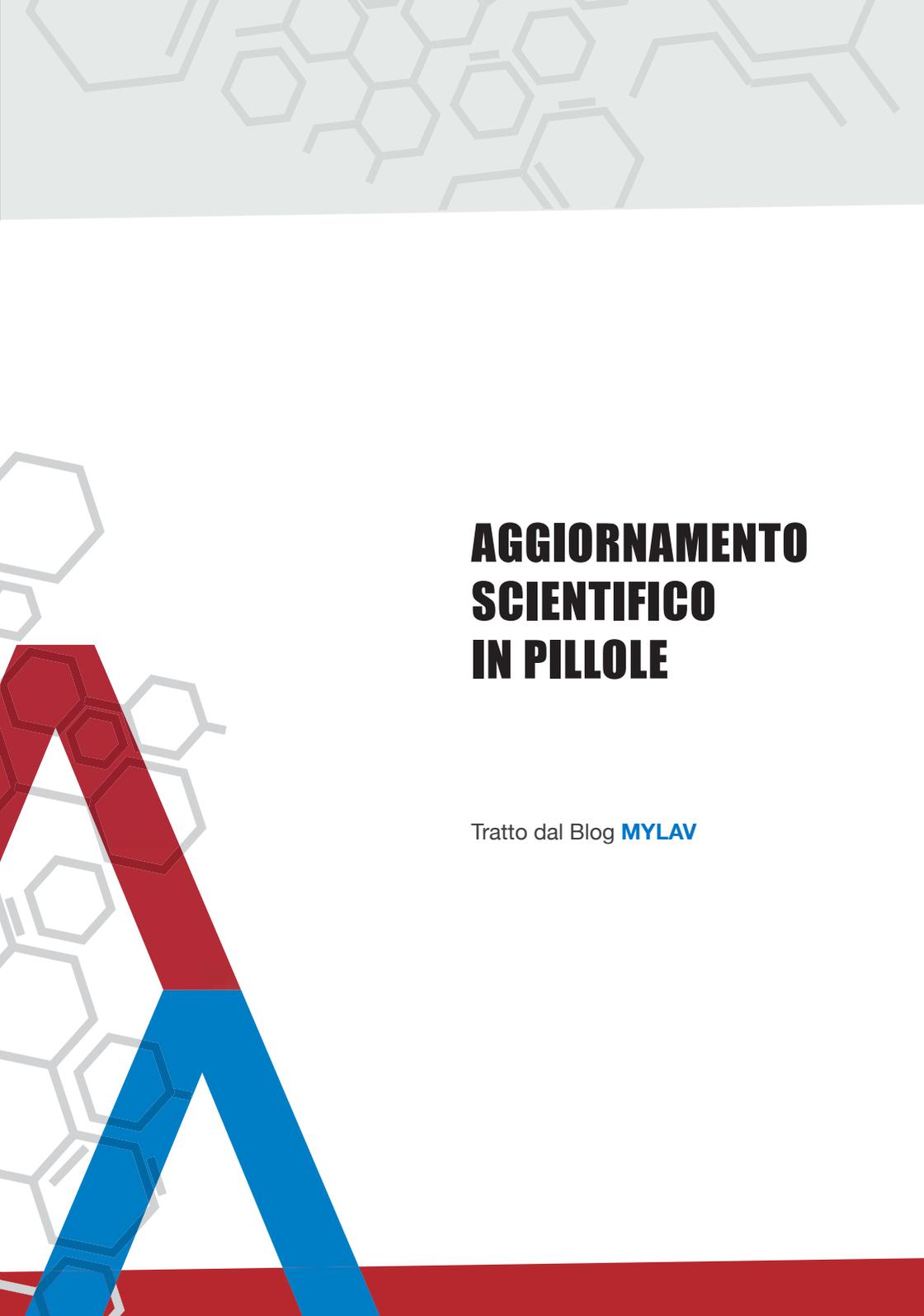
## AGGIORNAMENTO SCIENTIFICO IN PILLOLE

A cura di  
**Walter Bertazzolo e Ugo Bonfanti**  
Tutti gli Autori dei Post sono  
Consulenti MYLAV

Collana editoriale  
"Le pillole di scienza"  
realizzata da MYLAV - LA VALLONEA  
Vol. 2 anno 2018





The image features a light gray background at the top with faint, overlapping chemical structures. A large, stylized letter 'A' is positioned on the left side, composed of a red upper section and a blue lower section. The background is also filled with various chemical structures, including hexagons and rings, some in gray and some in red and blue.

# **AGGIORNAMENTO SCIENTIFICO IN PILLOLE**

Tratto dal Blog [MYLAV](#)

## Consulenti Mylav

Prof.ssa Francesca Abramo  
Dr. Francesco Albanese  
Prof. Luca Aresu  
Dr.ssa Barbara Banco  
Dr. Massimo Baroni  
Dr.ssa Silvia Benali  
Dr. Walter Bertazzolo  
Prof. Giuliano Bettini  
Dr. Ugo Bonfanti  
Dr. Enrico Bottero  
Prof. Paolo Buracco  
Prof. Carlo Cantile  
Dr. Davide De Lorenzi  
Prof. Nicola Decaro  
Dr. Francesco Dondi  
Dr. Giuseppe Febbraio  
Prof. Federico Fracassi  
Prof. Gualtiero Gandini  
Dr.ssa Floriana Gernone  
Dr.ssa Magda Gerou Ferriani  
Dr. Federico Leone  
Dr.ssa Laura Marconato  
Dr. Domenico Multari  
Dr.ssa Teresa Bruna Pagano  
Dr. Gustavo Picci  
Dr.ssa Maria Carmela Pisu  
Dr.ssa Federica Rossi  
Dr.ssa Giliola Spattini  
Dr. Giovanni Tortorella  
Dr. Luigi Venco

# Servizio di Consulenza: il portale [www.MyLav.net](http://www.MyLav.net)

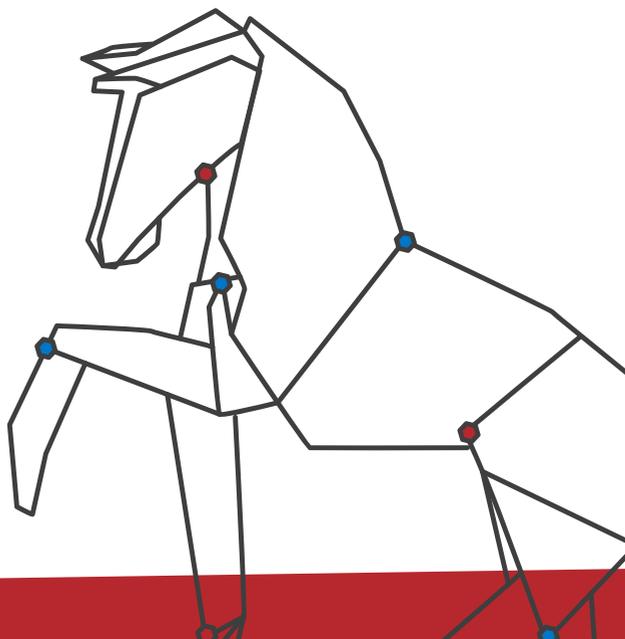


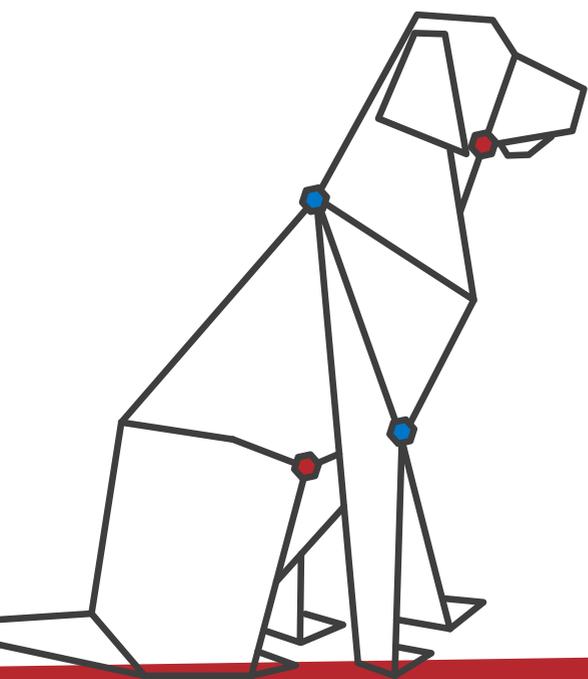
## MYLAV CONSULENZA

Il nostro servizio di consulenza  
per i casi **clinici più complessi**.

## MYLAV BLOG

Articoli di **aggiornamento scientifico**  
redatti dai nostri Consulenti.





# Presentazione

Cari Colleghi,  
vi presentiamo il Volume 2° della collana editoriale “Pillole di scienza” che raccoglie i più interessanti “Post di aggiornamento scientifico” pubblicati sul nostro **Blog MYLAV nell’anno 2017**.

Il Blog Mylav ([www.mylav.net](http://www.mylav.net)) è lo strumento che dà voce ai nostri Consulenti e ci permette di pubblicare settimanalmente consigli pratici, interviste su argomenti specifici, riassunti di articoli scientifici di recente pubblicazione ed anche quesiti di ci-tologia e di diagnostica utili per mettersi alla prova ed imparare.

Siamo “il Laboratorio dei Clinici per i Clinici” pertanto tutti gli argomenti vengono trattati e discussi in maniera pratica e semplice come può avvenire in una discussione fra colleghi ma senza rinunciare agli aspetti tecnici e scientifici.

Il Blog MYLAV viene curato da **Walter Bertazzolo** e **Ugo Bonfanti**.

Tutti gli Autori dei Post sono Consulenti La Vallonea e Collaboratori.

In versione e-Book e Audiobook.

*Dir. Resp. Isidoro Grillo*

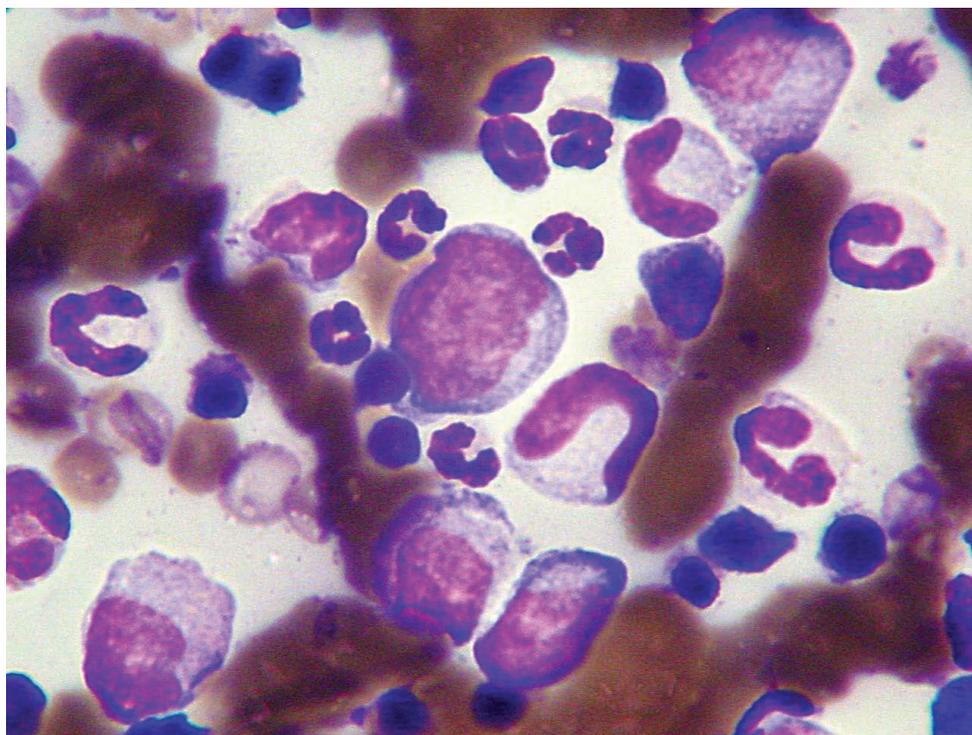
# ESAME DEL MIDOLLO OSSEO

## PARTE I: QUANDO E PERCHÉ ESEGUIRE UNA BIOPSIA MIDOLLARE?

di Walter Bertazzolo

Cari colleghi, con questo nuovo blog di informazione e formazione, iniziamo a trattare l'esame del midollo osseo.

Cercheremo di fare chiarezza sull'utilizzo di questa procedura diagnostica, spesso utilizzata in maniera inappropriata.



Per esperienze personali nella nostra casistica, questo è infatti l'esame che più spesso è associato a *campionamenti inadeguati*.

Ciò conduce a frustrazione da parte del patologo clinico che lo referta, oltre che insoddisfazione da parte del clinico e dei proprietari.

Affronteremo questo argomento in più puntate: in questo primo appuntamento cercheremo di chiarire quali siano le condizioni cliniche che necessitano realmente di un esame del midollo ematopoietico.

**Nella pratica clinica, l'esame del midollo osseo è consigliabile nelle seguenti situazioni:**

1) Anomalie ematologiche rilevate mediante esame emocromocitometrico che non possono essere spiegate dalle indagini cliniche e dagli esami di routine (es. citopenie periferiche, soprattutto se associate tra loro, presenza di cellule circolanti anomale, trombocitosi/leucocitosi persistenti).

La maggior parte delle alterazioni ematologiche periferiche può infatti trovare una giustificazione attraverso esami collaterali che esulano dal prelievo midollare. Facciamo alcuni semplici esempi:

- un paziente con grave anemia non rigenerativa ed insufficienza renale cronica non ha nessun bisogno di esame midollare, in quanto la causa dell'anemia è facilmente riconducibile alla ridotta produzione di eritropoietina conseguente alla patologia renale.
- un paziente con reazione leucemoide avrà quasi certamente una grave infezione localizzata in alcuni tessuti o sistemica, per cui in questo caso l'esame del midollo osseo non aggiunge nulla a quello che già individuiamo dall'esame emocromocitometrico; piuttosto sarà necessario ricercare la sede e la causa dell'infezione.
- un paziente con sindrome di Evans (anemia fortemente rigenerativa e trombocitopenia, entrambe di natura immunomediata) non ha nessun bisogno di esame midollare, in quanto già dall'emocromocitometrico sappiamo che il midollo sta funzionando (rigenerazione) e la risposta alle terapie immuno-soppressive ci confermerà il sospetto clinico.

2) Ricerca di neoplasie.

L'esame del midollo può essere indicato per la stadiazione di neoplasie extra-midollari (per es. linfoma, mastocitoma, carcinomi, ecc.), per l'identificazione di neoplasie primaria midollari (es. leucemie e mielomi) o per la ricerca di neoplasie occulte che abbiano dato metastasi midollari e conseguenti citopenie periferiche.

3) Iter diagnostico di problemi internistici quali febbre di origine sconosciuta, ipercalcemia, gammopatie mono- e poli-clonali: alcune di queste condizioni riconoscono infatti patologie primarie midollari (es. leucemie, mielomi) o con coinvolgimento midollare in corso di patologia sistemica (es. leishmaniosi).

4) Ricerca di agenti eziologici (Leishmania, infezioni fungine sistemiche, ecc.). Per la leishmaniosi in particolare, il midollo è generalmente il tessuto dal quale è più probabile individuare l'agente eziologico mediante esame citologico e biologia molecolare (PCR).

5) Valutazione di lesioni radiografiche ossee che possono suggerire un coinvolgimento midollare (mieloma multiplo, neoplasie ossee primarie, metastasi, malattie infiammatorie/infettive, ecc.).

In tutti questi casi è consigliabile il ricorso a campionamenti citologici e/o istologici di tessuto midollare ematopoietico, da sottoporre ad esame microscopico.

Va sottolineato, che è molto importante avere a disposizione un esame emocromocitometrico del paziente, eseguito in concomitanza del prelievo midollare. Inoltre, ogni altro esame fatto va riportato in anamnesi (es. Sierologie per malattie infettive, biochimica clinica, elettroforesi, ecc.) per facilitare l'interpretazione che dovrà essere fornita dal patologo clinico.

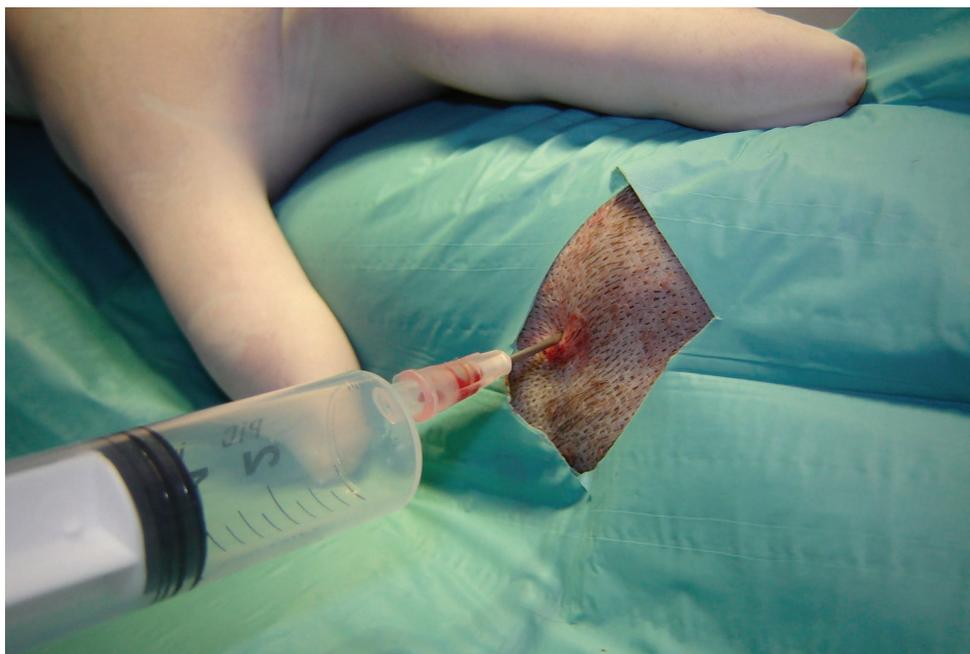
Infine è altrettanto consigliabile NON sottoporre i pazienti a terapie con farmaci immuno-soppressori (es. cortisonici), chemioterapici e trasfusioni di sangue prima di effettuare il prelievo midollare, per non creare condizioni confondenti all'interpretazione dei risultati.

## **ESAME DEL MIDOLLO OSSEO**

### **PARTE II: COME ESEGUIRE UN CAMPIONAMENTO CORRETTO**

di Walter Bertazzolo

Cari colleghi, in questa seconda parte dedicata all'esame del midollo osseo, ci occuperemo di una fase molto critica: il prelievo del campione.



*Nei video presenti sul nostro Blog potete vedere la procedura di campionamento.*

<http://www.mylav.net/blogc/view/140>

Questa procedura spaventa molti colleghi anche perché non è sempre semplice da eseguire. Inoltre, se non effettuata correttamente, condurrà sicuramente ad un campione inadeguato e non diagnostico.

Di seguito cercherò di spiegare come procedere in pratica, sia per quanto concerne i prelievi con ago sottile che per il campionamento di una “carota” di tessuto da destinare all'esame istologico.

## COME ESEGUIRE CORRETTAMENTE UN PRELIEVO DI MIDOLLO OSSEO

Descriveremo quali sono le sedi più adeguate e le modalità corrette per un campionamento di tessuto midollare.

**Tipi di biopsia.** Si possono eseguire due tipi di biopsie midollari: citologica ed istologica. Iniziamo con descriverne vantaggi e svantaggi e capire quindi quando è più indicato una o l'altra.

Entrambe sono metodiche relativamente semplici e solitamente prive rischi, ma devono venir spesso eseguite in sedazione profonda o anestesia generale, sebbene in pazienti defedati o di buona indole, può essere sufficiente l'anestesia locale mediante lidocaina.

La prima tecnica bioptica (**citologica**) è particolarmente indicata per la valutazione della morfologia cellulare o la ricerca di parassiti, la seconda (**istologica**) per valutare la cellularità o alterazioni strutturali quali ipoplasia/aplasia midollare, mielonecrosi, mielofibrosi, iperostosi e metastasi occulte.

Per valutare le diverse popolazioni cellulari e per fare stime quali/quantitative accurate è necessario quindi avere a disposizione buoni preparati citologici. In caso di tessuto midollare fortemente ipoplasico, aplasico, necrotico o fibrotico, è molto difficile ottenere campioni citologici adeguati ed è quindi necessario ricorrere ad una biopsia istologica. L'autore di solito preferisce tentare prima con un campionamento citologico, valutarlo subito microscopicamente e solo in caso di prelievo inadeguato, ricorrere anche alla biopsia istologica, in modo da verificare se l'inadeguatezza del campione sia da imputarsi a un problema intrinseco midollare oppure ad un errore di campionamento.

Tuttavia, ogni volta che ce ne sia la possibilità e che l'animale è stato anestetizzato, ritengo opportuno ottenere entrambi i tipi di campione, in particolare se non vi è la possibilità di effettuare una diagnosi citologica estemporanea. Ciò evita l'inconveniente di dover ri-anestetizzare il paziente e ri-campionare il midollo a distanza di giorni, dopo aver ricevuto un esito citologico non diagnostico.

**Aghi utilizzabili.** Le biopsie midollari si possono eseguire con aghi di diametro variabile, con o senza mandrino. Gli aghi mandrinati sono da preferirsi in quanto non si occludono durante l'inserimento e l'attraversamento del tessuto osseo, come capita invece spesso utilizzando aghi normali. I punti di reperi preferenziali sono l'epifisi prossimale omerale e femorale, la cresta iliaca, la giunzione costocondrale (solo per prelievi aspirativi e con aghi di piccolo calibro, >18G) e lo sterno.

Prima di procedere alla biopsia è sempre necessario preparare adeguatamente il campo operatorio (tricotomia e asepsi). Dopo la preparazione del campo è consigliabile eseguire un'incisione cutanea per facilitare l'introduzione dell'ago, qualora questo sia di dimensioni ragguardevoli (es. Ago per biopsia istologica).



*Esempio di aghi per biopsia midollare.*



*Esempio di utilizzo di ago rosa non mandrinato per il prelievo di midollo da omero prossimale in un gatto.*

**Anestesia.** La scelta del tipo di anestesia dipende ovviamente dallo stato del paziente, dalla sua indole e dal tipo di procedura più o meno invasiva. Ogni caso va pertanto valutato di concerto con l'anestesista.

**Modalità di prelievo.** I prelievi citologici (ago-aspirativi) vengono effettuati aspirando sangue midollare contenente le particelle di midollo osseo (spicole). L'ago va inserito con forza e con lievi movimenti rotatori nella sede prescelta, che deve essere adeguatamente localizzata (es. Giunzione costo-condrale delle coste, vedi video allegato al Blog).

Le sedi migliori per un prelievo con ago sottile sono la giunzione costo-condrale, le sternebre e la faccia laterale dell'ala dell'ileo, che non hanno una corticale ossea spessa e possono quindi essere perforate con un normale ago da 18-21 G).

La procedura di aspirazione più corretta prevede l'uso di siringhe di grande volume (> 5-10 mL), con le quali vengono eseguite aspirazioni vigorose e ripetute. Ciò permette il distacco più facile delle spicole midollari ed una minore contaminazione ematica. Il midollo aspirato deve essere strisciato immediatamente per evitarne la coagulazione. Alternativamente può essere mescolato ad una piccola quantità di EDTA (previamente posto nella siringa o nell'ago utilizzati per il prelievo) ed es-

sere processato entro poche ore. Non è consigliabile utilizzare altri anticoagulanti (es. eparina) in quanto i campioni così ottenuti non presentano una morfologia cellulare ben conservata.

Appena preparati, gli strisci devono essere fissati all'aria immediatamente (possibilmente con asciugacapelli o in stufa) e colorati con colorazioni del tipo Romanowsky (preferibilmente May-Grünwald-Giemsa).

L'adeguata preparazione dei campioni citologici è un'altra fase molto critica ai fini della corretta interpretazione poiché solo se adeguatamente strisciati, fissati e colorati possono essere adeguatamente valutati microscopicamente. Ci occuperemo di questa fase in maniera approfondita in una terza parte.

I prelievi needle-core vengono ottenuti con appositi aghi mandrinati per biopsie midollari od ossee. La tecnica è solitamente dolorosa e richiede l'utilizzo di protocolli anestesologici locali o generali. Le sedi preferenziali per l'esecuzione di una biopsia istologica midollare sono le epifisi prossimali di omero e femore e la cresta iliaca. Le prime due sedi sono di più semplice accesso anche per operatori non avvezzi alle tecniche ortopediche. Recentemente è stata descritta una tecnica di prelievo a partire dalla prima sternebra, isolabile e campionabile cranialmente anche in cani molto sovrappeso.

Una volta che l'ago mandrinato è stato introdotto nella corticale ossea, il mandrino viene tolto e la cannula viene sospinta in profondità nell'osso per 1-2 cm. Prima di ritrarla è consigliabile eseguire alcuni movimenti di lateralità per facilitare il distacco della "carota" midollare dalla base a cui è attaccata. La "carota" di tessuto prelevata viene fatta fuoriuscire dalla parte posteriore della cannula (mediante apposito specillo); successivamente deve essere fissata in formalina e processata mediante le comuni tecniche istopatologiche. Prima di essere posta in formalina, il frammento bioptico può essere rotolato delicatamente su vetrino per ottenere preparati per citologia, sebbene io sconsigli questa procedura che potrebbe danneggiare il frammento bioptico e condurre comunque a campioni citologici con cellule danneggiate.

**Problemi principali del prelievo.** Durante il campionamento sorgono spesso problemi tecnici che precludono la raccolta di materiale di qualità, vediamo alcuni esempi tipici:

- 1) L'ago non raggiunge la cavità midollare: questa è un'evenienza comune in caso di operatori poco esperti: solo una corretta manualità ed esercizio (es. prove su cadaveri) possono migliorare la tecnica.

- 2) L'ago si occlude durante l'entrata nell'osso: questo è un problema comune nei campionamenti con ago-sottile, soprattutto se effettuati dalla cartilagine costo-condrale. È necessario ripetere la procedura con nuovo ago, fino a quando arrivano gocce di sangue midollare nel cono dell'ago.
- 3) Il campione prelevato risulta coagulato: problema molto frequente e dovuto a procedura troppo lenta e/o all'assenza di anticoagulante nella siringa. Il sangue midollare coagula infatti molto rapidamente (pochi secondi). Velocizzando la procedura o usando siringhe precedentemente umidificate con EDTA si può ovviare al problema. Un midollo coagulato sarà pressoché inutilizzabile per una valutazione citologica, sebbene possa essere utilizzato per altre procedure (es. biologia molecolare).
- 4) Dall'aspirazione esce solo sangue: problema comune soprattutto nei pazienti molto anemici. Purtroppo in questi casi non è possibile discernere un'effettiva ipocellularità midollare (es. per aplasia, mielofibrosi, ecc.) da un errore di campionamento. Pertanto se il problema persiste anche dopo cambio di sede, è consigliabile eseguire anche una biopsia istologica.
- 5) Durante il campionamento istologico con aghi needle-core, non rimane materiale nella cannula. Questo è un problema non facile da ovviare e che può capitare sia per motivi tecnici (procedura inadeguata) che intrinseci al midollo. Si consiglia di ripetere il campionamento in altre sedi.

## **ESAME DEL MIDOLLO OSSEO**

### **PARTE III: COME ESEGUIRE UNO STRISCIO PERFETTO**

di Walter Bertazzolo



Cari colleghi, ecco il terzo appuntamento con i nostri consigli per ottenere dei campioni citologici midollari perfetti.

Non è sufficiente riuscire a prelevare un buon campione di tessuto ematopoietico, è altrettanto importante sapere come devono essere preparati gli strisci.

Nei due capitoli precedenti abbiamo descritto le indicazioni cliniche per un esame del midollo osseo e le modalità per un corretto campionamento di tessuto ematopoietico, sia per citologia che per l'esame istologico.

Mentre l'esame istologico viene eseguito secondo le normali procedure comuni anche ad altri campionamenti biotici (fissazione della frammento biotico in formalina ed invio al laboratorio per un esame istologico standard), la preparazione dei campioni citologici merita molta più attenzione. Infatti non è sufficiente riuscire a campionare del materiale diagnostico, è molto importante sapere anche come effettuare degli strisci di qualità, che possano essere leggibili da parte del patologo. È fondamentale capire che la valuta-

zione microscopica risulterà sicuramente infruttuosa se il campionamento è stato inadeguato e/o la preparazione degli strisci è stata effettuata in maniera scorretta.

**Primo step:** evitare che il campione coaguli.

Il sangue midollare coagula molto rapidamente (pochissimi secondi) per cui se non si attuano delle contromisure, sicuramente il prelievo midollare risulterà inutile.

Una prima precauzione che si può utilizzare è quella di inserire nel cono della siringa una piccola quantità di EDTA in modo che al momento dell'aspirazione del sangue midollare, questo risulti istantaneamente coagulato. In alternativa, bisognerà essere molto rapidi nell'aspirazione e nel successivo spostamento del prelievo in una provetta contenente EDTA (normali provette per esame emocromocitometrico). Se vi accorgete che purtroppo il campione è coagulato, mettete in preventivo che *quasi certamente quel prelievo risulterà inutile*.

In caso di prelievi di modesta entità, è possibile strisciare direttamente il midollo senza introdurlo prima in una provetta con anticoagulante, purché il tutto avvenga molto rapidamente.

**Secondo step:** fare uno striscio perfetto.

Capita frequentemente di analizzare campioni con buona cellularità, quindi potenzialmente di buona qualità, che purtroppo risultano impossibili da valutare microscopicamente a causa di una procedura di striscio scorretta. Se il campione prelevato è scarso (poche gocce di sangue midollare), si deve procedere immediatamente allo striscio ponendo una goccia su vetrino e strisciandola con un altro portaoggetti, cercando di fare un monostrato. Una procedura utile per ridurre la componente ematica del prelievo, è di far colare la goccia di sangue midollare tenendo il vetrino in posizione quasi verticale, e poi strisciare la stria di midollo con un altro vetrino posto in maniera perpendicolare, in modo che le spicole si schiaccino e si formi il monostrato di cellule. Uno degli errori più comuni che osservo personalmente, è la preparazione di strisci in realtà "non strisciati", ovvero lasciati colare sul vetrino portaoggetti ma non strisciati successivamente con un altro vetrino. Questa procedura produce campioni non valutabili e quindi è da evitare assolutamente.



*Figura 1 – Esempio di striscio inadeguato: il campione è stato fatto colare sul portaoggetti ma poi non è stato strisciato, rendendolo non valutabile.*



*Figura 2 – Esempio di campione correttamente strisciato (a destra) a confronto con uno non correttamente preparato (a sinistra).*

Il sottoscritto, se ha a disposizione una sufficiente quantità di sangue midollare raccolto in una provetta, procede con un altro sistema che aumenta la qualità dei campioni.

In breve, dispongo alcune gocce di sangue midollare su una superficie liscia quale una piastra di Petri o altro contenitore piatto (es. potreste usare i coperchi delle scatoline dei vetrini copri-oggetto); successivamente inclinandolo più volte cerco di spostare l'eccesso di sangue per visualizzare le spicole o particelle di midollo, riconoscibili in quanto rappresentate da frustoli biancastri/grigiastri in sospensione. Con una pipetta Pasteur cerco quindi di "pescare" queste particelle e le dispongo su un vetrino portaoggetti che userò per effettuare un normale striscio come sopra descritto. I vetrini così ottenuti devono essere rapidamente asciugati per esempio con un phone per capelli.

È consigliabile eseguire strisci multipli e colorarne almeno 1-2 subito per verificare rapidamente se il campione contiene almeno del materiale diagnostico oppure se è costituito esclusivamente da sangue, rendendolo quindi inutile per una valutazione microscopica.

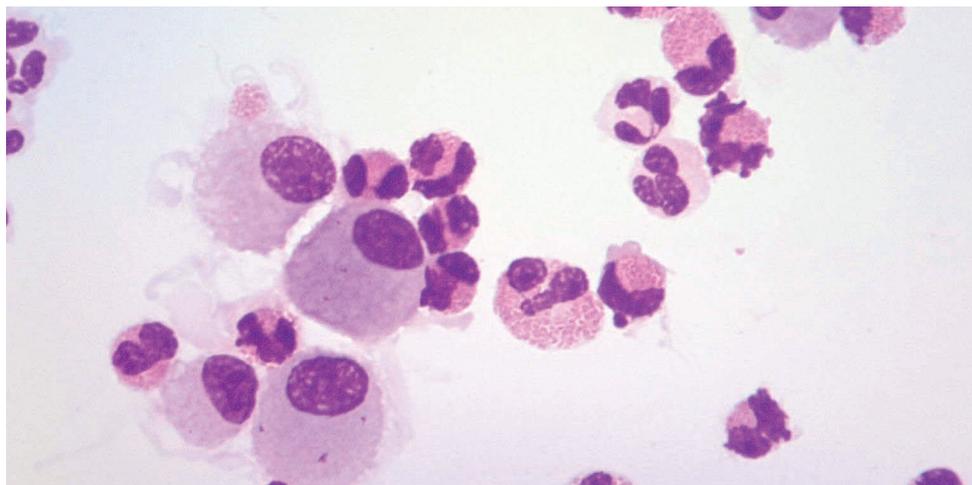
Si ricorda che al fine di una più accurata valutazione microscopica, è consigliabile l'utilizzo di colorazione May-Grünwald-Giemsa in luogo delle colorazioni ematologiche rapide.

Sul nostro Blog potrete visualizzare 2 video che vi mostrano rispettivamente il risultato di un campionamento non adeguato, perché costituito da materiale coagulato (video 1), nonché un esempio di come il sottoscritto prepara solitamente gli strisci midollari da un buon prelievo (video 2). <http://www.mylav.net/blogc/view/150>

## COME PREPARARE CORRETTAMENTE LE CITOLOGIE DA LAVAGGIO BRONCO-ALVEOLARE (BAL)

di Enrico Bottero e Davide De Lorenzi

Cari colleghi, abbiamo chiesto ai nostri consulenti in malattie respiratorie ed endoscopia, Enrico Bottero e Davide De Lorenzi, alcuni consigli essenziali per una corretta preparazione dei campioni citologici da lavaggio bronco-alveolare (BAL).



*Figura 1 – Esempio di un campione di buona qualità: le cellule appaiono ben conservate ed è semplice eseguire anche una conta differenziale.*

Come per altre citologie infatti, la qualità del campione è essenziale per ottenere informazioni diagnostiche utili.

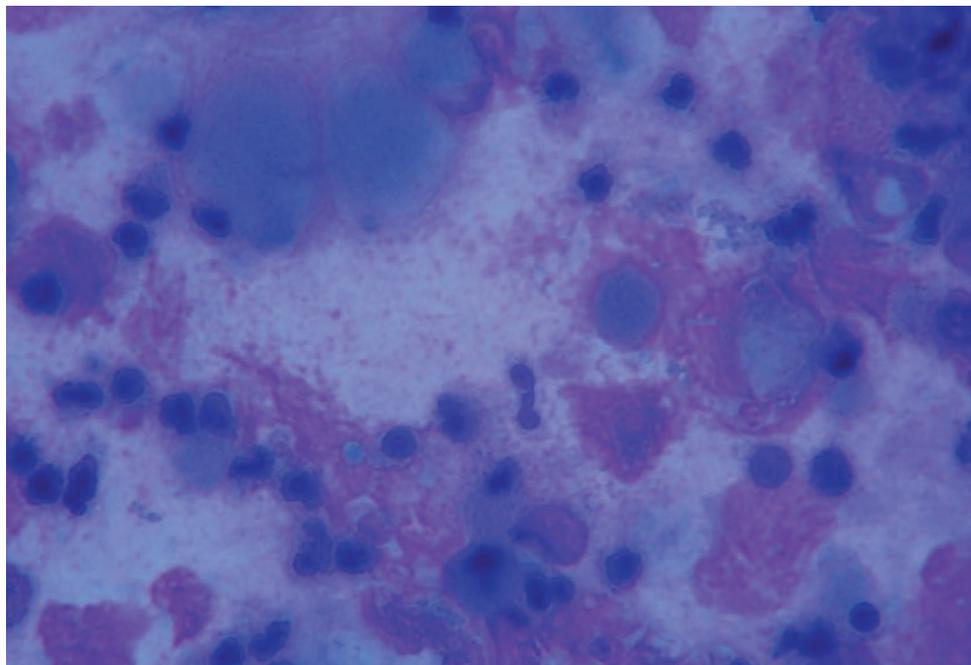
Purtroppo i campioni citologici da BAL risultano di scarsa qualità se non si seguono rigorosamente alcune regole fondamentali.

- 1) Come tutti i campioni in cui le cellule sono sospese in un liquido, nell'allestimento della citologia da BAL, la preparazione dei campioni deve essere la più rapida possibile, ed è meglio non ritardare l'allestimento oltre un'ora dalla raccolta. Per tale ragione è ovvio che gli strisci citologici dovranno essere preparati dal clinico e la procedura non dovrebbe essere demandata al laboratorio se non vogliamo rischiare di ottenere risultati insoddisfacenti.

- 2) Se abbiamo intenzione di eseguire un esame colturale dal materiale raccolto, la prima cosa da fare è raccogliere 2 ml di liquido e materiale mucoso in una siringa sterile da conservare refrigerata fino al momento della spedizione; il materiale raccolto non deve essere venuto a contatto con EDTA in quanto l'anticoagulante possiede proprietà batteriostatiche e potrebbero essere responsabile di falsi negativi. Il materiale per l'esame colturale dovrebbe idealmente raggiungere il laboratorio entro 24 ore dal prelievo oppure mediante terreni di coltura che possono prolungare la conservabilità del campione.
- 3) Se la provetta dove abbiamo raccolto il lavaggio contiene materiale flocculato, questo va raccolto con una pipetta o un ago da siringa e collocato su un vetrino quindi schiacciato con un altro vetrino in modo da ottenere due campioni citologici che andranno asciugati rapidamente (es. con asciugacapelli o calorifero), pena lo scadimento della qualità a causa di fenomeni di coartazione cellulare.
- 4) Dalla componente liquida è opportuno eseguire strisci diretti raccogliendo una goccia di liquido con una pipetta e strisciandola come faremmo con uno striscio di sangue. Questi campioni non sono molto utili per quanto riguarda l'interpretazione citologica poiché tendenzialmente ipocellulari ma possono dare una idea grossolana della cellularità del campione.
- 5) Per l'interpretazione citologica è indispensabile concentrare le cellule; la tecnica più semplice consiste nel centrifugare 5 ml (o tutta la quantità raccolta se l'aliquota è inferiore) per 10 minuti a bassa velocità. Eliminare quindi tutto il surnatante ad eccezione di una piccola quantità di sedimento, e procedere quindi a risospingere il pellet cellulare raccolto sul fondo della provetta, agitando la stessa per qualche secondo.
- 6) Raccogliere una goccia di materiale così preparato e allestire almeno 2 vetrini per striscio come descritto al punto (4); anche in questo caso è opportuno fare asciugare i campioni rapidamente, possibilmente con una fonte di aria calda.
- 7) Ricordarsi di specificare con chiarezza quali campioni sono allestiti per striscio diretto e quali dopo centrifugazione, annotandolo chiaramente sul vetrino in maniera indelebile.

A questo punto i campioni possono essere inviati al laboratorio per le colorazioni di routine, senza speciali precauzioni. Si ricorda solo di proteggerli in maniera

appropriata per evitare la loro rottura e, cosa alquanto importante, non inviarli con campioni per istologia (cioè nella stessa scatola contenente barattoli di formalina) che renderanno la citologia pressoché illeggibile, a causa della deposizione di vapori di formalina.



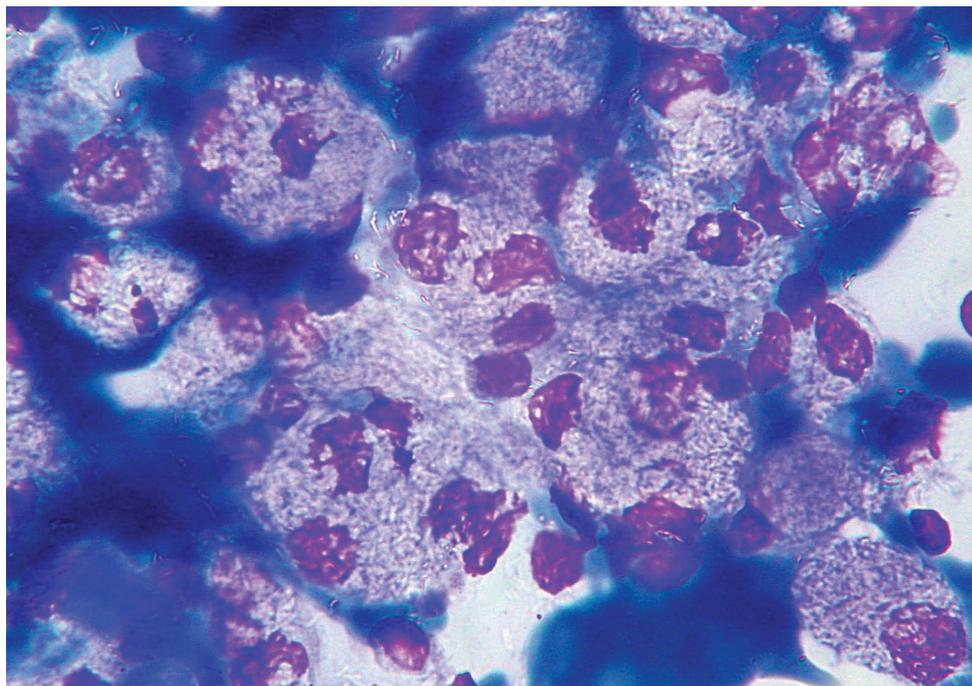
*Figura 2 – Esempio di un campione di cattiva qualità, poco utile a fini diagnostici: le cellule appaiono coartate o danneggiate e non è agevole un riconoscimento definitivo.*

## LE COLORAZIONI CITOCHIMICHE/ISTOCHEMICHE

### PARTE 1: LO ZIEHL-NEESEN

di Maria Massaro & Walter Bertazzolo

Cari colleghi, in questi articoli spieghiamo l'utilità delle colorazioni cito/istochimiche in diagnostica.



*Figura 1 – Micobatteri non colorati presenti all'interno dei macrofagi.*

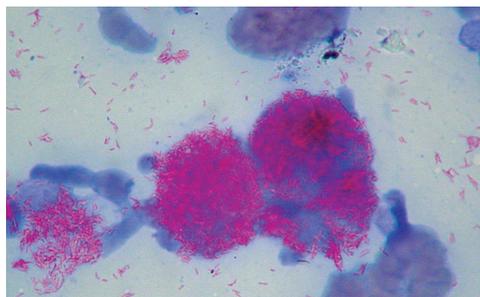
Queste colorazioni speciali sono applicate ai campioni citologici o istologici allo scopo di evidenziare particolari componenti tissutali (es. fibre collagene, fibre elastiche, ecc.), accumuli di sostanze anomale o in eccesso rispetto alla normalità (es. amiloide, sali di calcio, rame, ferro, ecc.), o agenti eziologici (es. funghi, micobatteri, ecc.).

Di solito vengono consigliate dal patologo qualora lo ritenga necessario per affinare la diagnosi microscopica.

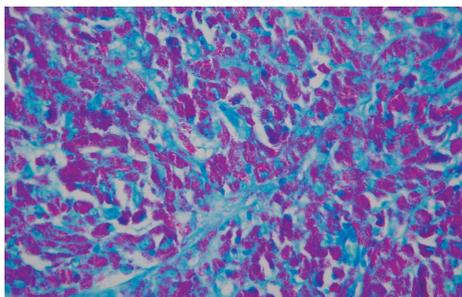
Inizieremo oggi a parlarvi della colorazione di Ziehl-Neelsen: questa metodica è utilizzata qualora si sospettino delle infezioni causate da micobatteri e può venir applicata sia su preparati citologici (anche se già colorati con metodiche di routine, come diff-quick o May-Grunwald-Giemsa) che istologici.

I micobatteri presentano una parete complessa contenente peptidoglicani, gattani, acidi micolici e glicolipidi fenolici che non permette l'ingresso dei normali coloranti utilizzati di routine. Pertanto nei preparati standard possono facilmente passare inosservati o apparire come batteri non colorati all'interno di macrofagi (Figura 1 sopra).

Con il trattamento utilizzato durante la colorazione di Ziehl-Neelsen, il pigmento (rosso della carbol-fucsina) viene "forzato" ad entrare all'interno dei batteri mediante una combinazione di calore e agenti chimici, rendendo i micobatteri ben visibili in citologia ed istologia.



*Figura 2 – Campione citologico, colorazione di Ziehl-Neelsen: micobatteri visibili di color rosso fucsia.*



*Figura 3 – Campione istologico, colorazione di Ziehl-Neelsen: numerosi micobatteri di color fucsia.*

Questa colorazione permette quindi al patologo di confermare il sospetto iniziale di infezione da micobatteri alcool-acido resistenti. Non permette però di differenziarli nelle varie specie: a questo scopo è necessario una successiva tipizzazione mediante esame colturale o più facilmente con PCR.

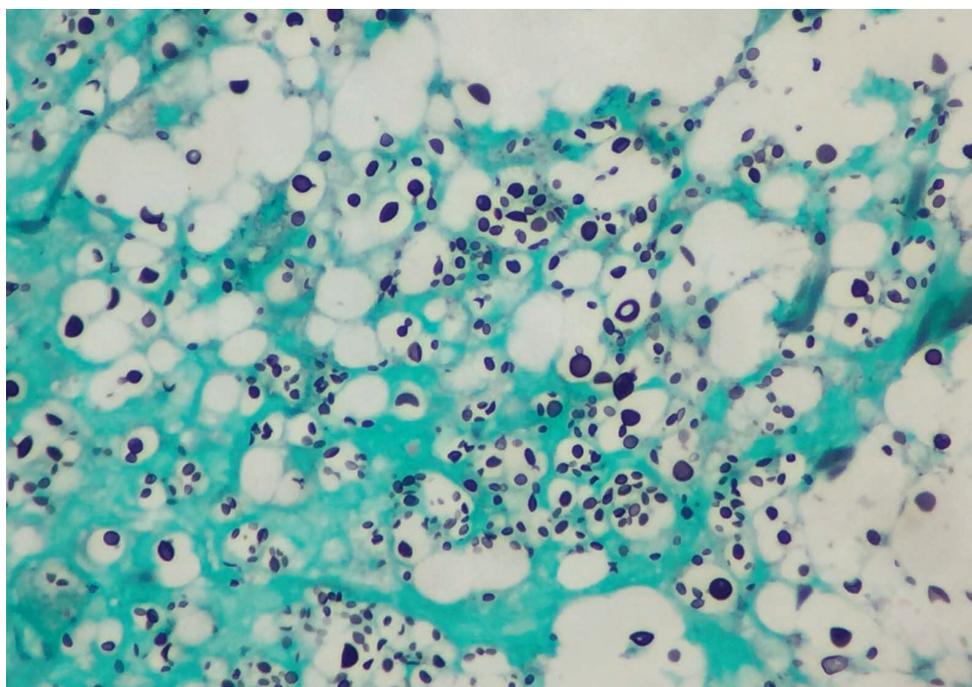
# LE COLORAZIONI CITOCHIMICHE/ISTOCHIMICHE

## PARTE 2: LA GROCOTT

di Maria Massaro & Walter Bertazzolo

Cari colleghi,

continuiamo a parlarvi delle colorazioni cito/istochimiche ed, in particolare, parleremo in questo articolo della colorazione di Grocott: tale metodica viene eseguita qualora si sospetti la presenza di *funghi* sia su campione citologico sia su campione istologico.

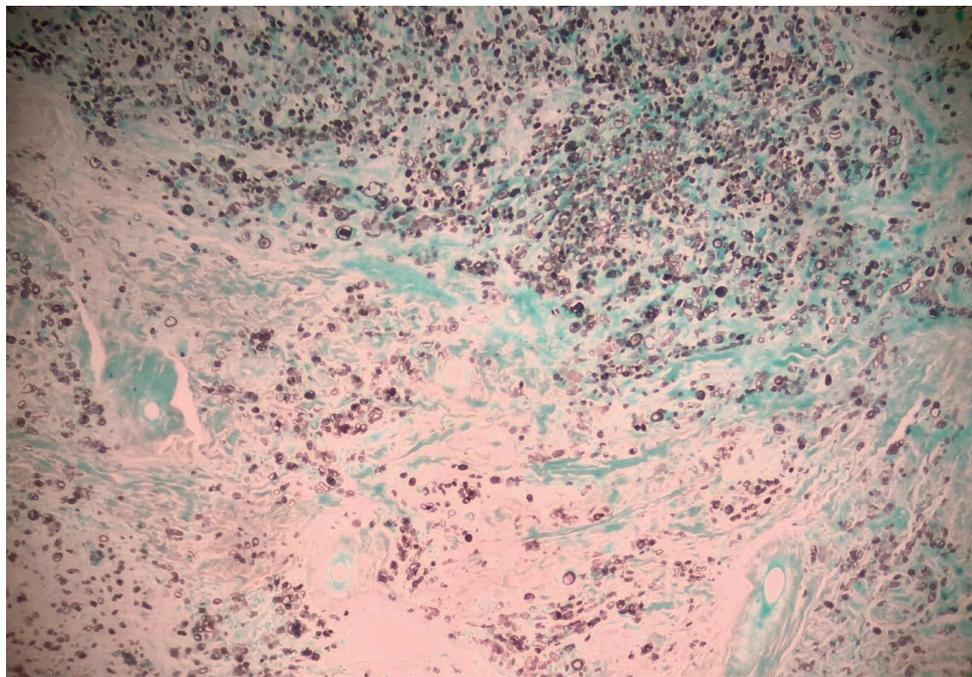


*Figura 1 – Infezione da criptococchi, esame istologico: la capsula fungina appare incolore mentre il copro fungino e la sua parete assumono colore marrone scuro.*

La maggior parte dei miceti presentano una parete cellulare costituita da polisaccaridi e chitina: la rottura della catena polisaccaridica, mediante l'acido cromico, permette all'argento cloruro facente parte del complesso argento-metenamina

di ridursi ad argento metallico diventando così visibile: pertanto le cellule fungine saranno colorate di nero rispetto al resto del tessuto che sarà colorato di verde.

Anche alcune alghe patogene (come la *Prototheca*) si colorano bene con lo stesso metodo (Figura 2).



*Figura 2 – Infezione da Prototheca su preparato istologico.*

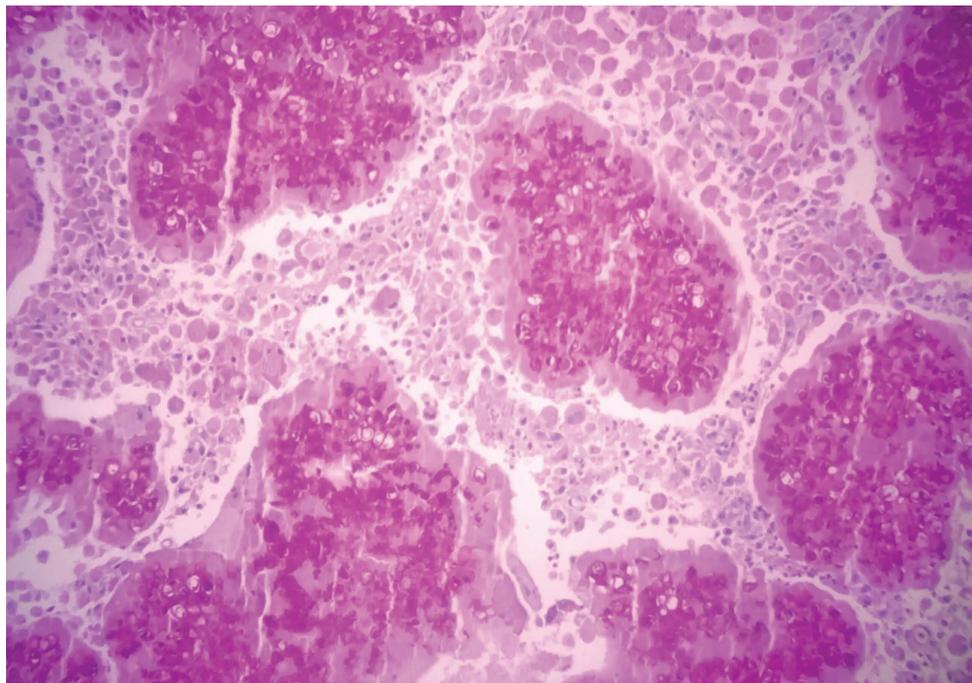
Questa colorazione permette dunque al patologo di confermare il sospetto di infezione fungina (o da alcune alghe patogene) ma non permette tuttavia di differenziare i miceti nelle varie specie, le quali possono essere discriminate esclusivamente mediante coltura e/o PCR.

## LE COLORAZIONI CITOCHIMICHE/ISTOCHIMICHE

### PARTE 3: IL PAS

di Maria Massaro & Walter Bertazzolo

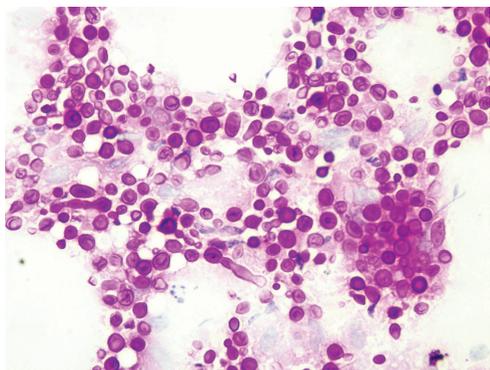
Cari Colleghi, continuiamo a parlarvi dell'utilità delle colorazioni cito/istochimiche ed in particolare in questo articolo della colorazione PAS, il cui acronimo sta per Periodic Acid Schiff.



*Figura 1 – Esempio di pseudomicetoma dermatofitico cutaneo in cui le colonie fungine assumono un brillante color magenta (preparato istologico).*

Tale colorazione sta a dimostrare la presenza di polisaccaridi (semplici e mucopolisaccaridi) che assumeranno una colorazione rosso-magenta dopo trasformazione di alcuni gruppi chimici pre-esistenti in aldeidi: tale trasformazione chimica avviene mediante l'azione dell'acido periodico, mentre la colorazione rosso-magenta è indotta dal reattivo di Schiff.

La colorazione è utile nel caso si sospettino accumuli di glicogeno, coliti istiocitarie, infezioni fungine e nella valutazione dell'integrità delle membrane basali a livello cutaneo e renale.



*Figura 2 – Esempio di colorazione di criptococchi colorati con PAS su preparato citologico.*

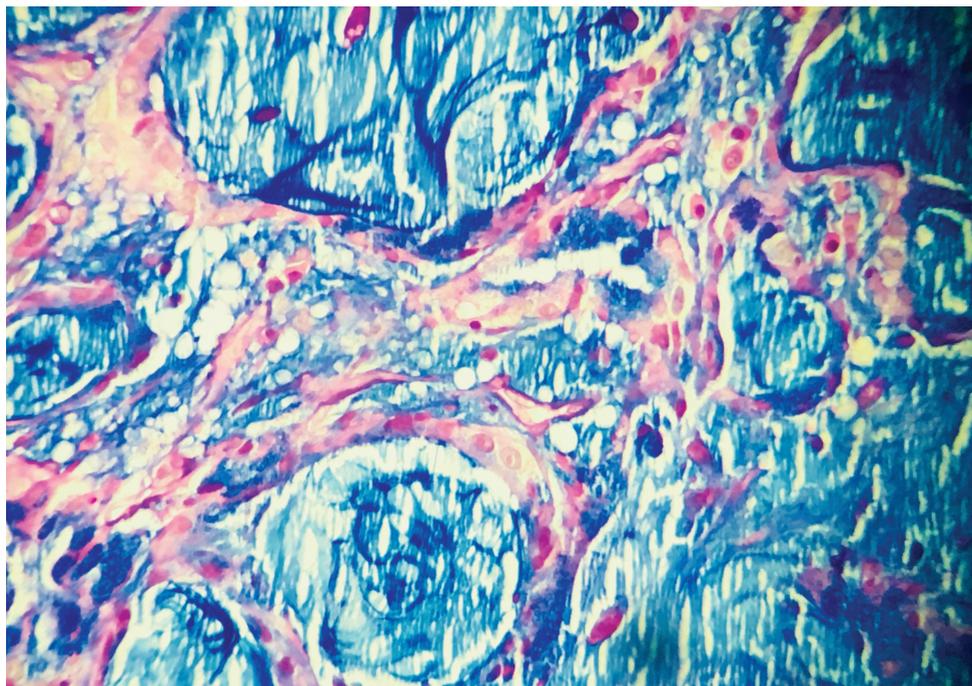
La reazione PAS evidenzia la presenza di mucopolisaccaridi non acidi: quelli acidi sono invece differenziabili attraverso la reazione alcian blu-PAS di cui parleremo in seguito.

## LE COLORAZIONI CITOCHIMICHE/ISTOCHEMICHE

### PARTE 4: L'ALCIAN-PAS

di Maria Massaro, Giovanni Tortorella, Teresa Pagano e Walter Bertazzolo

Cari colleghi, potrà capitare che a seguito di un esame istologico, il patologo consigli di eseguire la colorazione Alcian-PAS: a cosa serve?



Questa colorazione istochimica viene richiesta allorché l'istopatologo voglia valutare la produzione di mucine.

Il termine “mucina” si riferisce a un grande gruppo di macro-molecole che sostanzialmente si dividono in mucine secretorie, che sono glicoproteine prodotte da vari epitelii ghiandolari e mucine stromali (glicosaminoglicani che contengono acido ialuronico) e che vengono storicamente identificate come “sostanza mixoide” prodotta da alcuni tessuti connettivi.



L'Alcian blu – PAS è la migliore colorazione per evidenziare le mucine.

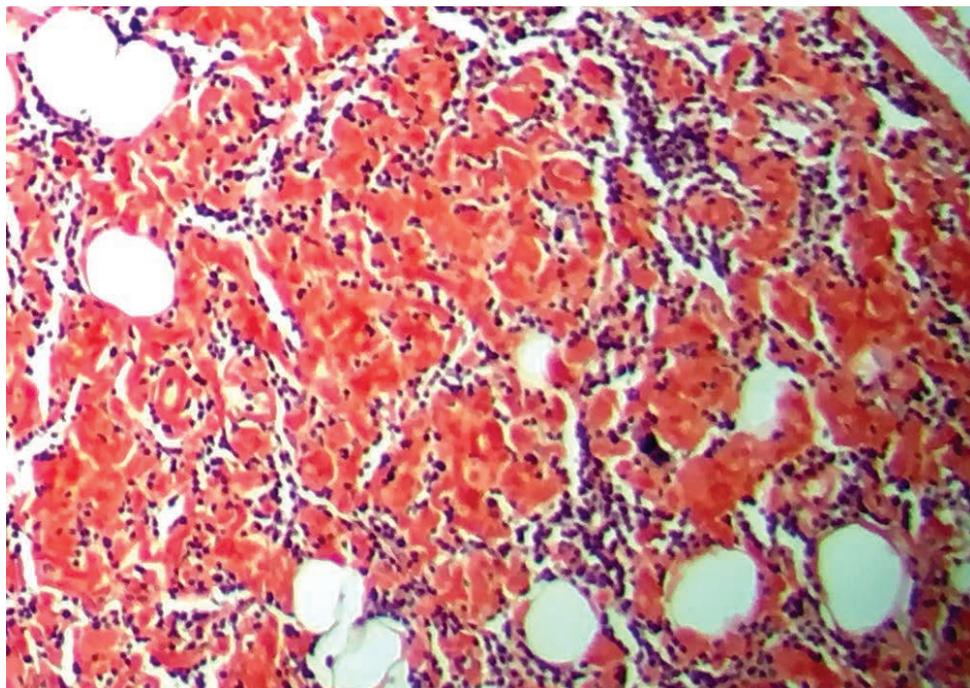
Un tipico caso esemplificativo in cui l'uso dell'Alcian – PAS è fondamentale, è un tipo di carcinoma gastrico caratterizzato da imponente desmoplasia stromale e cellule neoplastiche, solitamente ad anello con castone, isolate nello stroma – quadro che potrebbe far pensare erroneamente ad una forma di sarcoma.

L'uso di tale colorazione mette in luce le mucine citoplasmatiche delle cellule neoplastiche confermando invece l'origine epiteliale ghiandolare della neoplasia.

## LE COLORAZIONI CITOCHIMICHE/ISTOCHEMICHE PARTE 5: IL ROSSO CONGO

di Maria Massaro & Walter Bertazzolo

Cari Colleghi, vi parleremo oggi della colorazione cito/istochimica rosso Congo, richiesta dal patologo qualora sospetti un accumulo di sostanza amiloide.



*Figura 1 - esempio di plasmocitoma con abbondante deposito di sostanza amiloide rosso arancio.*

L'amiloide è una proteina patologica che si deposita negli spazi interstiziali di vari tessuti. In realtà questa sostanza può avere una composizione ed una patogenesi molto differente, anche se l'aspetto microscopico è sovrapponibile.

Nelle forme familiari (es. gatti Abissini e cani di razza Shar Pei) e in quelle associate ad alcuni processi infiammatori è causata da una mancata degradazione di un derivato dalla proteina di fase acuta amiloide sierica A (SAA).



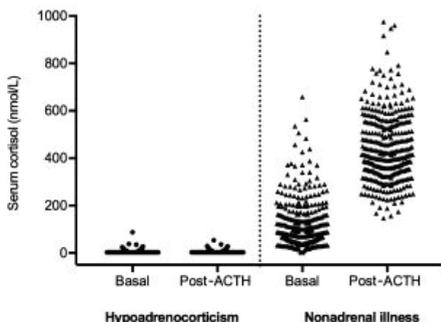
Nelle forme associate a neoplasie maligne linfoidi (es. mieloma, plasmacitoma) è invece derivata da un accumulo delle catene leggere di immunoglobuline patologiche.

Per poter identificare con certezza la sostanza amiloide in un campione citologico o istologico è necessario sottoporre i preparati alla colorazione con rosso Congo. Con le comuni colorazioni di routine la sostanza amiloide appare amorfa, fibrillare e di color rosa.

Dopo trattamento con rosso Congo diventa invece rossa brillante. Il legame tra amiloide e Rosso Congo non è chiaro se sia dovuto ai componenti proteici o quelli polisaccaridici dell'amiloide stessa, o ambedue, tuttavia certa è la birifrangenza marcata che mostra tale sostanza dopo il legame con il Rosso Congo. Infatti mentre al microscopio ottico la colorazione Rosso Congo conferisce all'amiloide una colorazione rosso-rosa, al microscopio a luce polarizzata questa assumerà una caratteristica birifrangenza verde comune a tutte le forme di amiloidosi e dovuta alla capacità delle fibrille amiloidi di formare foglietti  $\beta$  incrociati.

# CORTISOLO BASALE NELLA DIAGNOSI DI IPOADRENOCORTICISMO CANINO: QUANDO PUÒ ESSERE UTILE?

di Walter Bertazzolo & Federico Fracassi



Cari colleghi appassionati di endocrinologia, vi siete mai chiesti quale possa essere l'utilità della sola cortisolemia basale nella diagnosi di ipoadrenocorticismo canino?

Ebbene, per rispondere a questa domanda, vi sottoponiamo questa settimana un recente articolo pubblicato sul JVIM da autori americani.

Come vedrete la *sola cortisolemia basale* spesso è utile, soprattutto per **escludere** la malattia (un valore basale > 2 µg/dL tende ad escludere il morbo di Addison con certezza pressoché assoluta).

Valori estremamente bassi di cortisolo basale (< 0,8 µg/dL) sono invece molto suggestivi di Addison.

Valori border-line di cortisolo basale (0,8-2 µg/dL) sono dubbi e vanno sempre verificati anche con il cortisolo post-ACTH.

Come al solito vi allegiamo un riassunto in italiano del lavoro. Per chi invece volesse leggere interamente l'articolo originale, può scaricarlo liberamente sul sito della rivista.

## Tratto da:

*Evaluation of Basal Serum or Plasma Cortisol Concentrations for the Diagnosis of Hypoadrenocorticism in Dogs*

Gold AJ et al. – *J Vet Intern Med* 2016;30:1798–1805

## INTRODUZIONE

L'ipoadrenocorticismo è una patologia endocrina con un comportamento clinico subdolo, caratterizzata da una carenza di glucocorticoidi e spesso anche di mineralcorticoidi, spesso dovuta a distruzione immunomediata della corteccia surrenalica.

Alcuni animali non hanno le classiche alterazioni elettrolitiche tipiche della carenza di mineralcorticoidi (iponatriemia ed iperkaliemia).

Il gold standard diagnostico è costituito dalla misurazione della cortisolemia prima e dopo un'ora dalla somministrazione endovenosa di ACTH sintetico (test di stimolazione con ACTH).

È stata valutata la possibilità di utilizzare la sola cortisolemia basale per la diagnosi di ipoadrenocorticismo, utilizzando il valore di 55 nmol/L (2 µg/dL) come valore soglia.

Tale valore soglia possiede elevata sensibilità (virtualmente nessun cane con Ipo-adrenocorticismo presenta valori SUPERIORI di cortisolemia, ossia TUTTI i cani con ipoadrenocorticismo hanno valori INFERIORI a tale soglia) ma bassa specificità (MOLTI CANI con valori INFERIORI a 2 µg/dL non hanno questa disendocrinia): tale valore soglia pertanto risulta UTILE ad ESCLUDERE l'IPOADRENOCORTICISMO in caso di risultati SUPERIORI a 2 µg/dL.

Scopo del presente lavoro è stato valutare l'utilità diagnostica della concentrazione basale di cortisolo, a differenti valori soglia in un maggior numero di cani affetti da ipoadrenocorticismo, con e senza alterazioni elettrolitiche.

## MATERIALI e METODI

Sono stati inclusi cani con sospetto clinico di ipoadrenocorticismo che sono stati sottoposti al test di stimolazione con ACTH tra gennaio 2005 e settembre 2015, ai quali sono stati anche misurati gli elettroliti al ricovero, ed entro 7 giorni dal test di stimolazione con ACTH.

La cortisolemia è stata misurata prima e dopo 1 ora dalla somministrazione endovenosa di ACTH sintetico (250 µg, oppure 5 µg/kg).

I pazienti sono stati divisi in tre gruppi in base alla concentrazione di cortisolo post ACTH:

- 1) il gruppo con diagnosi di ipoadrenocorticismo (cortisolo post ACTH  $\leq$  55 nmol/L ossia  $<$  2 µg/dL);
- 2) il gruppo senza patologia surrenalica (cortisolo post ACTH  $>$ 138 nmol/L ossia  $>$  5 µg/dL);
- 3) Cani con concentrazione di cortisolo post – ACTH tra 55 nmol/L e 138 nmol/L sono stati considerati dubbi.



Sono stati infine individuati cani con profilo elettrolitico normale ed anormale: sono stati considerati profili anormali quelli in cui:

- 1) Na:K ratio < 28
- 2) Na < 143 mmol/L in presenza di K > 4.3 mmol/L
- 3) Na < 146 mmol/L in presenza di K > 5.2 mmol/L.

## RISULTATI

Sono stati inclusi 1023 cani a cui è stato effettuato un test di stimolazione con ACTH. Di questi, la diagnosi di ipoadrenocorticismo è stata confermata in 163 pazienti; tra loro, *il 17% (28) non presentava anomalie elettrolitiche.*

La concentrazione basale mediana di cortisolo nei pazienti con ipoadrenocorticismo e di quelli con assenza di patologia surrenalica era rispettivamente  $\leq 5.5$  nmol/L (0.2  $\mu\text{g/dL}$ ) e 82 nmol/L (3  $\mu\text{g/dL}$ ), mentre la concentrazione mediana di cortisolo post stimolazione con ACTH era rispettivamente  $\leq 5.5$  nmol/L (0.2  $\mu\text{g/dL}$ ) e 415 nmol/L (15  $\mu\text{g/dL}$ ).

Nei pazienti con ipoadrenocorticismo, non sono state osservate differenze statisticamente significative della cortisolemia basale, tra i gruppi di pazienti con e senza alterazioni elettrolitiche.

Il valore di cortisolemia basale con maggiore capacità discriminante è stato 22 nmol/L (0,8  $\mu\text{g/dL}$ ), con sensibilità pari a 96,9%, e specificità del 95,7%. Valori di cortisolemia basale più bassi (5.5 nmol/L – 0.2  $\mu\text{g/dL}$ ) possedevamo ovviamente specificità maggiore, ma minore sensibilità. Valori di cortisolemia basale più elevati (55 nmol/L – 2  $\mu\text{g/dL}$ ) possedevamo ovviamente sensibilità maggiore, ma minore specificità.

## DISCUSSIONE – CONCLUSIONI

Il valore di cortisolemia basale è statisticamente inferiore nei pazienti con ipoadrenocorticismo rispetto a quelli senza patologia surrenalica. Il valore soglia di 55 nmol/L (2  $\mu\text{g/dL}$ ) si conferma possedere elevata sensibilità ma bassa specificità, che può essere aumentata riducendo il suddetto valore a 22 nmol/L (0,8  $\mu\text{g/dL}$ ). Valori soglia pari a (5.5 nmol/L – 0.2  $\mu\text{g/dL}$ ) posseggono specificità elevatissime (99,1%: pochissimi cani normali possiedono valori così bassi di cortisolemia basale).

L'utilità diagnostica della cortisolemia basale è sovrapponibile tra i cani con alterazioni elettrolitiche e quelli che non le manifestano (circa 20% – ipoadrenocorticismo da carenza di glucocorticoidi).

Una percentuale ridotta di cani (1,5%) possiede risultati di cortisolemia post ACTH considerati dubbi / equivoci (tra 55 nmol/L e 138 nmol/L), che potrebbero rappresentare una forma "atipica" della patologia, o uno stadio iniziale di ipoadrenocorticismo.



## PERCHÉ TESTARE GLI ORMONI SESSUALI NEL CANE E NEL GATTO?

di Maria Carmela Pisu



Cari colleghi, ci vengono spesso chieste informazioni sul dosaggio degli ormoni sessuali. Quali e perché misurarli? In quali situazioni sono indicati? E quali protocolli si devono utilizzare?

La nostra consulente in Riproduzione Maria Carmela Pisu, diplomata all'European College of Animal Reproduction, risponde alle domande più frequenti che spesso ci vengono rivolte dai nostri clienti.

### **Come, quando e perché dosare gli ormoni sessuali**

Il ciclo delle femmine dei mammiferi è strettamente regolato dall'alternarsi di ormoni che determinano tutti gli eventi che portano all'ovulazione, all'instaurarsi e al mantenimento della gravidanza.

Gli ormoni sessuali permettono inoltre la produzione di spermatozoi e la loro corretta maturazione nelle gonadi maschili, la corretta libido, il trofismo delle ghiandole sessuali e la differenziazione dei caratteri sessuali secondari.

La corretta valutazione degli ormoni sessuali nella pratica clinica è utilizzata per valutare il momento di massima fertilità, il corretto funzionamento delle gonadi e conseguenti cause di infertilità o ipofertilità.

Gli ormoni sessuali che è utile dosare nel cane e nel gatto sono: Progesterone, Estradiolo, Testosterone, Ormone luteinizzante (LH) e Ormone anti-Mulleriano (AMH).

## **Progesterone**

Il dosaggio del progesterone nella cagna è di grandissima utilità ed ha importanti indicazioni in momenti diversi della vita riproduttiva.

La misurazione del progesterone deve sempre essere effettuata su siero e sarebbe anche utile eseguire i prelievi sempre nella stessa fascia oraria, poiché è stato dimostrato un lieve aumento dei valori nelle ore pomeridiane.

L'utilizzo principale del dosaggio del progesterone è quello di monitorare il momento ovulatorio. Conoscere il giorno in cui la cagna ovula è fondamentale per la gestione delle monte e per inquadrare alcune patologie, conoscere la data del parto ed è importante per decidere il momento dell'ovariectomia elettiva.

### Monitoraggio dell'ovulazione

Come in tutte le femmine, il periodo fertile propriamente detto (cioè quello in cui gli ovociti sono pronti per essere fecondati dagli spermatozoi) è limitato e dura circa 3 giorni, ma il periodo fecondo, cioè quello che può portare a gravidanza, è più ampio perché la cagna spesso accetta l'accoppiamento già dai primi giorni di estro anche se l'ovulazione avviene molto più avanti e gli spermatozoi del cane hanno una capacità di sopravvivenza nelle vie genitali femminili di molti giorni.

È però noto che più è aperta la forbice di tempo che va dalla monta al momento di fertilizzazione degli ovociti, meno numerosa è la cucciolata che si può ottenere, a causa del minor numero di spermatozoi ancora capaci di fecondare e del maggior numero di riassorbimenti embrionali, dovuti ad embrioni imperfetti a causa di una fecondazione di ovociti da parte di spermatozoi vecchi.

Per questo motivo, anche se la cagna avrà un accoppiamento naturale, è importante sapere qual è il momento ideale per la monta, e diventa quindi fondamentale



conoscere i giorni più indicati se invece si deve procedere a inseminazione artificiale con seme refrigerato o congelato.

A differenza di tutte le altre specie, la cagna ovula dopo 48h dal picco dell'LH e poiché gli ovociti al momento dell'ovulazione sono ancora immaturi, la fecondazione potrà avvenire solo 48-72h dopo l'ovulazione stessa. Di queste particolarità fisiologiche va tenuto conto quando si programma una monta.

Poiché l'ovulazione avviene 48h dopo il picco dell'LH, il gold standard per l'individuazione sarebbe il dosaggio di questo ormone ma andrebbe ripetuto 2 volte al giorno per poterne individuare il picco.

La cagna ha però un'altra importante particolarità: pertanto le cellule della granulosa iniziano a luteinizzare e a produrre progesterone prima dell'ovulazione; al momento del picco dell'LH la progesteronemia è compresa tra 2,5-3 µg/ml e al momento dell'ovulazione è compresa tra 5-10 µg/ml.

Questa particolarità permette di utilizzare il dosaggio del progesterone al posto del dosaggio dell'LH e di effettuare i dosaggi a distanza di 48h e non di 12h (con notevole risparmio economico e soprattutto di stress per la fattrice).

Inoltre poiché dal picco dell'LH al momento in cui si dovrà effettuare la monta o l'inseminazione passano 4 giorni, dosando il progesterone non c'è l'assoluta necessità di ricevere i risultati in giornata avendo comunque tempo per pianificare tutte le procedure.

#### Corretta datazione del parto

Conoscendo il momento ovulatorio è possibile datare con certezza il momento del parto che avviene sempre 63 giorni+/-1 giorno dall'ovulazione.

Questo dato permette di fissare con tranquillità il taglio cesareo elettivo e soprattutto permette di intervenire immediatamente in caso di gravidanze protratte o di problemi in corso di gravidanza a termine.

#### Inquadramento di alcune patologie

Molte delle patologie ginecologiche possono iniziare solo sotto l'influsso di alcuni ormoni.

È il caso, ad esempio, della piometra che inizia sempre in fase diestrale, quindi con progesteronemia alta. Nel momento in cui si sospetta una piometra il dosaggio del progesterone (o anche solo un colpocitologico) può confermare o escludere la possibilità di questa patologia, anche se la diagnosi solitamente si basa su altri rilievi clinici e di diagnostica per immagini.

Il dosaggio del progesterone risulta invece quasi indispensabile nel momento in cui ci si accinge a trattare a livello medico la piometra e son passati quasi 2 mesi dal calore.

In questo caso infatti, poiché l'aglepristone svolge la sua funzione antagonizzando il progesterone, è fondamentale sapere che la progesteronemia è ancora  $> 3 \mu\text{g/ml}$ ; in caso contrario è necessario ricorrere alla chirurgia.

### Conferma di residuo ovarico

Una delle metodiche per la conferma di residuo ovarico secernente è quella di stimolare il tessuto alla luteinizzazione con 250-500UI di HCG (gonadotropina corionica umana) per via SC, a seconda della taglia della paziente, e di dosare 8-10 giorni dopo il progesterone. Una progesteronemia  $> 2 \mu\text{g/ml}$  conferma il residuo.

### **Estradiolo**

È l'ormone sessuale prodotto dalle cellule della granulosa del follicolo.

Va sempre dosato su siero.

Il suo dosaggio basale è poco utile nella cagna in cui l'estrogenemia superiore ai livelli basali induce cheratinizzazione delle cellule della mucosa vaginale, facilmente evidenziabile con la colpocitologia. Il dosaggio basale può invece essere utile nella gatta in cui non sempre è possibile ottenere dei buoni campioni per la colpocitologia.

Nella cagna il dosaggio dell'estradiolo diventa invece molto utile dopo stimolazione per confermare il sospetto di residuo ovarico.

La stimolazione con GnRH (ormone rilasciante le gonadotropine) – analogo (Buserelin, Receptal®) è infatti, insieme al dosaggio dell'AMH, il metodo ad oggi consigliato dalla letteratura per la ricerca di residuo.

Dopo aver fatto un prelievo al T0 per un dosaggio basale dell'estradiolo, si somministra GnRH (buserelin) a  $0,12 \mu\text{g/kg}$  per EV, corrispondente a  $0,03 \text{ ml/kg}$  di peso corporeo ( $0,4 \mu\text{g/kg}$  nella gatta) di buserelin. Si esegue un secondo dosaggio a 120 minuti: valori di estradiolo superiori ai limiti basali indicano residuo ( $> 12\text{pg/ml}$  o raddoppio del basale).

Sia la sensibilità che la specificità del test di stimolazione con buserelin si attestano al 100% con un valore cutoff di  $11 \text{ pmol/L}$ .



Nel cane maschio, il dosaggio dell'estradiolo può essere utile per confermare il sospetto clinico di neoplasia testicolare estrogeno-secerne. Dosaggi superiori a 15 pg/ml sono già indicativi.

## **LH**

L'LH è la gonadotropina ipofisaria che induce ovulazione e luteinizzazione delle cellule della granulosa nella femmina e produzione di testosterone nelle cellule del Leydig nel maschio.

Il test va effettuato su siero.

Il suo dosaggio è il gold standard in tutte le specie per l'individuazione del momento ovulatorio ma, come detto precedentemente, poiché il picco di questo ormone ha una durata molto limitata nel tempo andrebbero effettuati dosaggi ogni 12 ore. Nella cagna data la luteinizzazione preovulatoria e il conseguente aumento preovulatorio del progesterone, la sua misurazione per l'individuazione del momento ovulatorio ha quindi scarsa rilevanza clinica.

Il dosaggio dell'LH può essere utile per l'individuazione di presenza di gonadi.

Come in tutte le specie infatti in seguito a sterilizzazione viene a mancare il feedback ovarico sull'ipotalamo e ne consegue una costante secrezione di gonadotropine.

Questa costante produzione è rilevabile con un LH costantemente  $> 1 \mu\text{g/ml}$  in cagne e gatte ovariectomizzate. Per questo aspetto fisiologico il dosaggio dell'LH è stato proposto come test per l'individuazione di residui ovarici. Numerosi studi sono stati recentemente pubblicati sull'uso di questa metodica e tutti sono concordi nell'indicare il dosaggio dell'LH molto sensibile ma molto meno specifico dei test di stimolazione con GnRH e HCG (la sensibilità è di circa il 99% mentre la specificità, a seconda della pubblicazione, varia dal 78% al 93% con una frequenza di falsi positivi di circa il 10-12%). Un altro problema è che sia nella cagna che nella gatta, si nota un marcato aumento dell'ormone nelle prime settimane post-sterilizzazione per poi ridiscendere a livelli basali per alcuni mesi e avere il definitivo innalzamento solo dopo 12-16 mesi dalla chirurgia. Questo andamento va considerato attentamente prima di interpretare i risultati.

## **Testosterone**

Il dosaggio del testosterone è utile in tutti i casi di infertilità o ipofertilità dei cani maschi. È molto meno utile nel gatto maschio in cui l'evidenza clinica di corretta

testosteronemia è data dalla presenza (o assenza nei soggetti orchiettomizzati correttamente) delle spicole peniene.

A causa dell'importante fluttuazione della testosteronemia nell'arco delle 24 ore, il solo test basale ha scarso valore e quindi non è consigliato. Si deve pertanto effettuare il dosaggio dopo stimolazione con 250-500 UI di HCG (variabile in base alla taglia) o 0,12 mg/kg di buserelin entrambi per via EV. Il prelievo post stimolazione va effettuato dopo 90 minuti. Un soggetto maschio intero normale ha una testosteronemia  $> 1 \mu\text{g/ml}$ .

Il dosaggio post stimolazione in casi di ipoproduzione e infertilità permette di stabilire se il problema è di pertinenza testicolare, ipotalamica o ipofisaria. L'autrice preferisce partire prima con la stimolazione mediante GnRH analogo, per motivi di praticità (possibilità di arrivare più velocemente ad una diagnosi).

Stimolando con buserelin (analogo sintetico del GnRH), se la testosteronemia post-stimolazione risulta  $> 1 \mu\text{g/ml}$  significa che l'asse ipofisi-testicolo funziona correttamente. Nel caso in cui nonostante una normale concentrazione di testosterone post-buserelin, persistano segni di ridotta capacità di secernere testosterone (costante scarsa libido, testicoli sotto dimensionati, ecc.), va considerata la possibilità che sia l'ipotalamo incapace di secernere sufficienti quantità di GnRH.

Se invece la testosteronemia post-buserelin risulta  $< 1 \mu\text{g/ml}$ , il problema potrebbe essere di natura ipofisaria (mancata risposta e produzione di gonadotropine ipofisarie) o testicolare (mancata risposta alle gonadotropine ipofisarie da parte di un testicolo ipotrofico). Per dirimere questo dilemma, si deve procedere alla stimolazione con HCG (il test va rifatto dopo almeno 24 ore dal precedente): l'HCG ha infatti un effetto simil-LH: in presenza di tessuto testicolare normale stimolerà la produzione di una adeguata quantità di testosterone da parte delle cellule di Leydig. Se la testosteronemia post-HCG è superiore a  $1 \mu\text{g/ml}$  significa che i testicoli sono correttamente in grado di secernere l'ormone (quindi il problema è ipofisario); se la testosteronemia post-HCG rimane  $< 1 \mu\text{g/ml}$  significa che il danno è testicolare.

Il dosaggio post stimolazione può essere utile anche nei rari casi in cui si debba verificare un'avvenuta castrazione e non si riescano ad evidenziare i testicoli ecograficamente.

## AMH

L'ormone antimulleriano è prodotto dalle cellule della granulosa dell'ovaio e quindi è un eccellente marker di presenza delle gonadi nella femmina.



Per questo motivo negli ultimi anni è stato ampiamente studiato per valutare se potesse essere utilizzato come indicatore di residuo ovarico post sterilizzazione.

Numerosi studi hanno dimostrato che esiste una differenza statisticamente significativa tra soggette sterilizzate e cagne intere o con residuo ovarico, mentre sono praticamente sovrapponibili i valori tra questi ultimi due gruppi.

Anche nelle gatte il dosaggio dell'AMH ha il 100% di sensibilità e specificità nel determinare la presenza o l'assenza di tessuto ovarico.

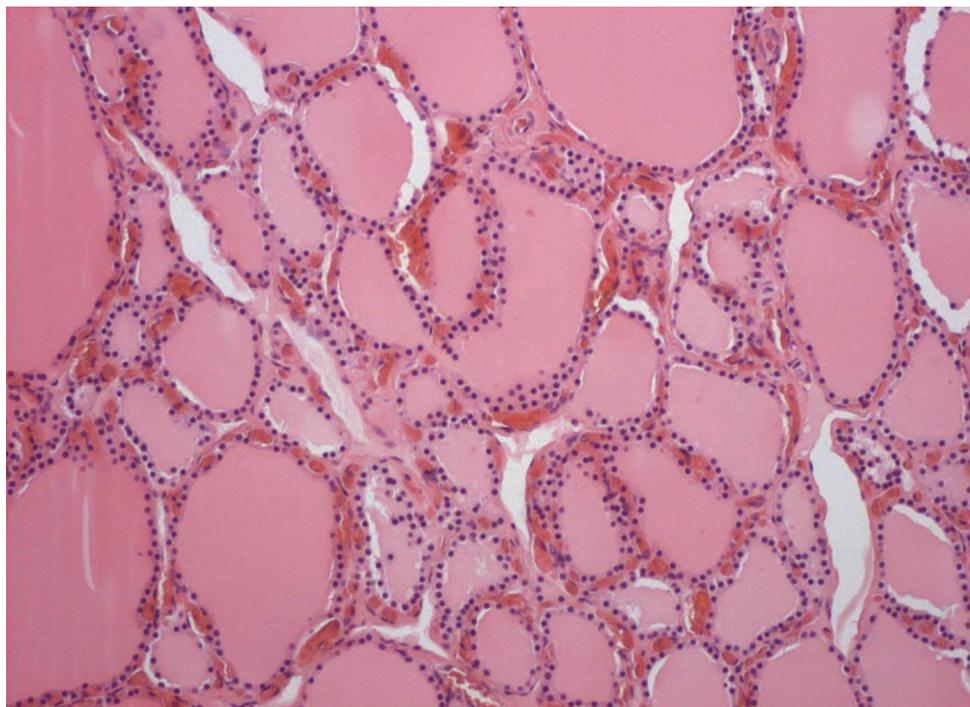
Il dosaggio del AMH è quindi un test sicuro per l'individuazione delle gonadi o di residui ovarici; al momento la maggiore limitazione del test è soltanto il costo e il tempo per l'esecuzione dell'esame. Anche nel maschio, nel quale l'AMH è prodotto a livello testicolare, l'ormone può essere utilizzato per la conferma di presenza di gonadi ma, mentre la specificità è sempre del 100%, la sensibilità si attesta all'80%. La sensibilità del test può essere portata sino al 100% associando un dosaggio del testosterone sierico.

## **Bibliografia**

- 1) Gary England e Angelika von Heimendahl Riproduzione e neonatologia del cane e del gatto 2 ed.
- 2) Rohlertz M, Ström Holst B, Axné E. Comparison of the GnRH-stimulation test and a semiquantitative quick test for LH to diagnose presence of ovaries in the female domestic cat. *Theriogenology*. 2012 Dec;78(9):1901-6.
- 3) Löfstedt RM1, Vanleeuwen JA Evaluation of a commercially available luteinizing hormone test for its ability to distinguish between ovariectomized and sexually intact bitches. *J Am Vet Med Assoc*. 2002 May 1;220(9):1331-5.
- 4) de Souza MB, England GC, Mota Filho AC, Ackermann CL, Sousa CV, de Carvalho GG, Silva HV, Pinto JN, Linhares JC, Oba E, da Silva LD Semen quality, testicular B-mode and Doppler ultrasound, and serum testosterone concentrations in dogs with established infertility. *Theriogenology*. 2015 Sep 15;84(5):805-10.
- 5) Themmen AP, Kalra B, Visser JA, Kumar A, Savjani G, de Gier J, Jaques S The use of anti- müllerian hormone as diagnostic for gonadectomy status in dogs. *Theriogenology*. 2016 Oct 1;86(6):1467-74.
- 6) Axné E, Ström Holst B Concentrations of anti-Müllerian hormone in the domestic cat. Relation with spay or neuter status and serum estradiol. *Theriogenology*. 2015 Mar 15;83(5):817-21.

# IPERTIROIDISMO FELINO E INSUFFICIENZA RENALE

di Ugo Bonfanti



Cari colleghi, pubblichiamo questa settimana un riassunto relativo ad una recente review pubblicata sul prestigioso *Journal of Feline Medicine and Surgery*, riguardante gli effetti dell'ipertiroidismo sulla funzione renale dei gatti.

## Tratto da:

*Effects of feline hyperthyroidism on kidney function: a review Vaske HH et al. – Journal of Feline Medicine and Surgery 2016; Vol 18 (2); pagg.55-59.*

## INTRODUZIONE

L'ipertiroidismo e l'insufficienza renale cronica (CKD) sono patologie comuni nei gatti geriatrici.

La CKD è una patologia irreversibile a carico del nefrone, che colpisce frequentemente l'animale adulto-anziano con un'incidenza superiore al 30% in soggetti di età superiore ai 15 anni.

L'ipertiroidismo è la disendocrinia più comune nella specie felina e colpisce circa il 6% dei pazienti con età superiore ai 9 anni. L'effetto finale della iperattività della tiroide, è una "sindrome ipermetabolica".

Il tempo medio di sopravvivenza di gatti ipertiroidei con CKD diminuisce sensibilmente rispetto al tempo medio di sopravvivenza dei gatti ipertiroidei non azotemici (0.5-2.0 anni vs 1.6-4.0 anni, rispettivamente).

### **Effetti tireotossici sulla funzionalità renale:**

- L'ipertiroidismo, se trascurato, causa alterazioni emodinamiche gravi, in particolare a carico del rene, provocando alterazioni della funzionalità renale o un peggioramento del quadro di insufficienza renale pre-esistente.
- L'ipertiroidismo causa incremento del flusso ematico renale (RBF) e della frazione di filtrazione glomerulare (GFR). La valutazione della funzione escretoria dei reni viene valutata mediante la misurazione dell'azotemia ed indirettamente della GFR. La presenza di concomitante ipertiroidismo può alterare l'interpretazione di questi parametri.
- L'aumento della GFR indotta dall'ipertiroidismo può mascherare una sottostante riduzione della GFR causata dalla CKD: spesso la diagnosi di CKD viene emessa dopo che la condizione di eutiroidismo è stata ristabilita.

Effetti del trattamento dell'ipertiroidismo sulla funzionalità renale:

- Il successo del trattamento terapeutico, indipendentemente dall'opzione scelta, porta ad un ripristino dello stato di eutiroidismo con la normalizzazione della velocità di filtrazione glomerulare che può determinare un conseguente aumento della concentrazione sierica di creatinina anche in animali normo-azotemici. Circa il 30% dei pazienti ipertiroidei sviluppa azotemia conclamata dopo il trattamento.
- È stato dimostrato come, dopo il ripristino della condizione di eutiroidismo, il valore di creatinina serica possa tendere ad incrementare progressivamente per 6 mesi. Risulta pertanto consigliabile che i clinici monitorino il valore della

creatinina per almeno 6 mesi anche se la funzionalità renale tende a rimanere apparentemente stabile.

- Il monitoraggio dei livelli di ormoni tiroidei, in particolare la combinazione di una ridotta concentrazione di T4 totale e un'elevata concentrazione di TSH, permette al clinico di individuare un eventuale stato d'ipotiroidismo iatrogeno conseguenza della terapia.
- Occorre prestare attenzione ai gatti con ipotiroidismo iatrogeno per il possibile sviluppo di iperazotemia post-terapia. È stato dimostrato che gatti con azotemia post-terapia avevano anche tempi di sopravvivenza inferiori rispetto a gatti ipertiroidei non azotemici.

### **Esami predittivi dello sviluppo di azotemia post trattamento:**

- Risulterebbe importante poter prevedere pazienti che sviluppano iperazotemia post-terapia. Attualmente i valori di creatinina ed urea ematici e PS urinario pre- trattamento non sono di supporto in tal senso.
- Molti gatti ipertiroidei risultano, prima del trattamento, proteinurici. La proteinuria tende a risolversi entro 4 settimane dall'inizio della terapia.
- N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG) e Retinol Binding Protein (UBP), enzimi urinari riferibili a danno tubulare misurati nei gatti ipertiroidei non trattati, tendevano a diminuire a seguito della terapia, indicando che le alterazioni tubulari renali associate all'ipertiroidismo tendevano a risolversi ripristinando la condizione eutiroidea.

### **CONCLUSIONI**

Attualmente, nessun biomarker serico o urinario è in grado di predire accuratamente lo sviluppo di CKD in soggetti ipertiroidei dopo l'inizio della terapia.

Viene raccomandato di trattare l'ipertiroidismo con la finalità di raggiungere concentrazioni di T4 in corrispondenza del valore minimo dell'intervallo di riferimento, senza raggiungere uno stato di ipotiroidismo.

Trattando un paziente non azotemico è necessario ricordare che l'aumento della concentrazione serica della creatinina può verificarsi fino a 6 mesi dopo la condizione di eutiroidismo: la creatininemia deve pertanto essere monitorata nel tempo.



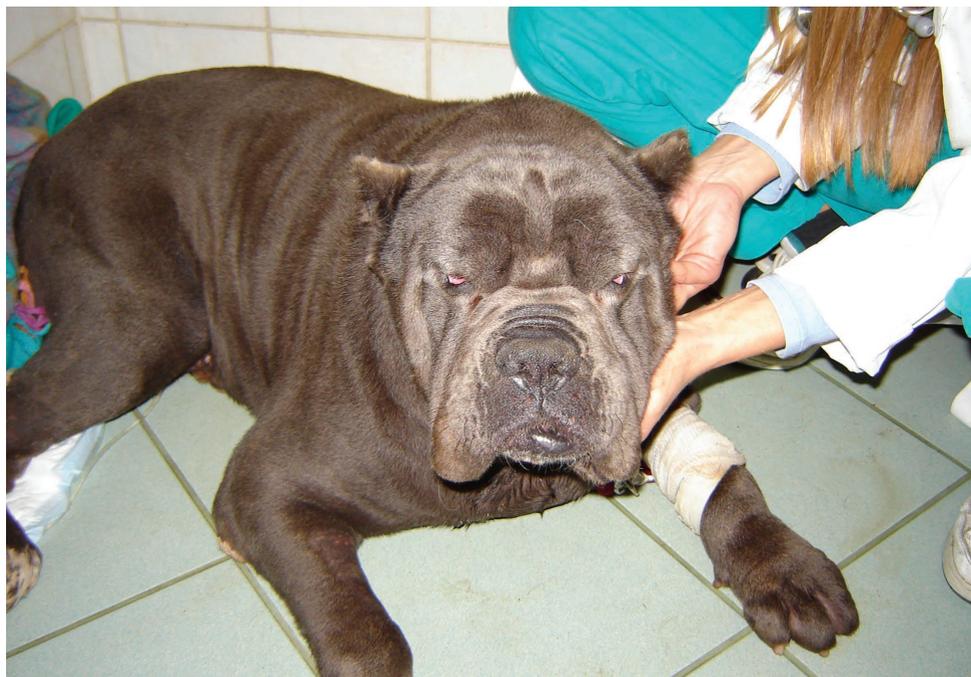


Trattando un paziente azotemico (con CKD), occorre comunicare al proprietario le ridotte aspettative di vita di paziente con CKD pretrattamento, e monitorare adeguatamente nel tempo la funzionalità renale.

Infine, T4 e TSH devono essere monitorati per almeno 6 mesi dopo il ripristino delle condizioni di eutiroidismo, regolando la terapia o somministrando T4 in caso di ipotiroidismo iatrogeno.

## COME I FARMACI INFLUENZANO I TEST DI FUNZIONALITÀ TIROIDEA NEL CANE

di Walter Bertazzolo



Cari colleghi, quante volte ci capita di avere un sospetto di ipotiroidismo canino da verificare con appropriati test endocrini ma nel frattempo il cane ha assunto o sta assumendo i farmaci più disparati.

Vi siete mai chiesti quale può essere il loro effetto sui test di funzionalità tiroidea?

Per alcuni principi attivi esistono evidenze scientifiche pubblicate, che abbiamo voluto riassumere nella tabella allegata.

### **Influenze dei farmaci sui profili tiroidei canini**

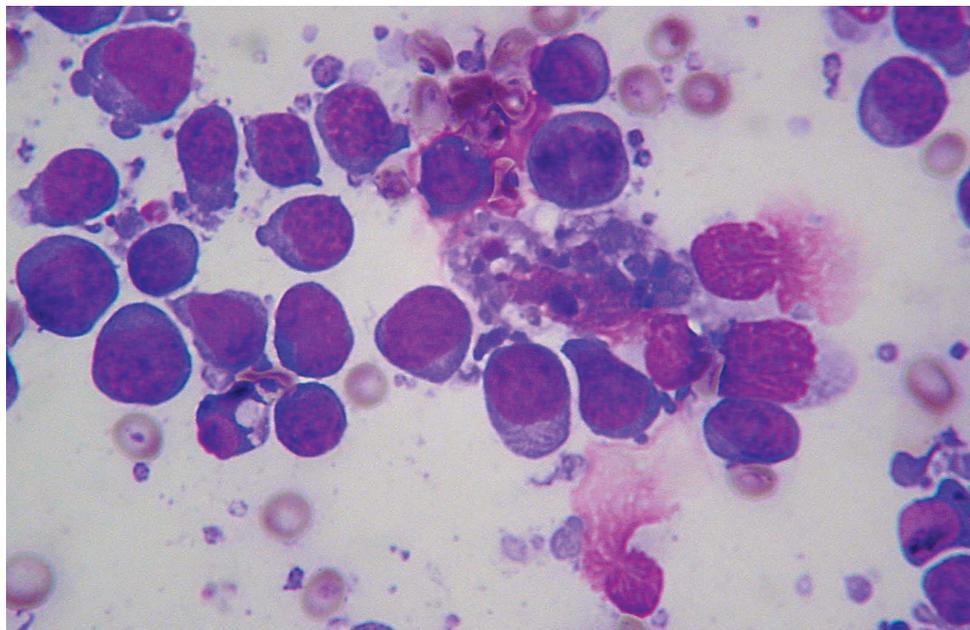
La presente tabella rappresenta una linea guida pratica che riassume l'effetto di alcuni farmaci sui risultati dei test di funzione tiroidea nel cane. Vengono ovviamente riportati quei principi attivi per i quali esiste una letteratura documentata, ma non

si possono ovviamente escludere altri farmaci a tale lista, per i quali non esistono ancora evidenze scientifiche.

FARMACO	tT4	fT4	TSH	Test di stimolazione con rh-TSH
Cortisonici (in particolare a dosaggi immuno-soppressivi)	↓	=/↓	=	Risposta attenuata con dosaggi elevati e/o prolungati
Bromuro di potassio	=	=	=	=
Fenobarbitale	↓	=/↓	=/↑	Dati non disponibili
Imepitoina	=	=	=	Dati non disponibili
Sulfamidici	↓	↓	↑	↓
Carpofene	=/↓	=/↓	=/↓	Dati non disponibili
Aspirina	↓	=	=	Dati non disponibili
Meloxicam	=	=	=	Dati non disponibili
Ketoprofene	=	=	=	Dati non disponibili
Clomipramina	↓	↓	=	Dati non disponibili
Anestesia generale	↓	↑	Dati non disponibili	Dati non disponibili

# TEST DI CLONALITÀ LIFOIDE: ALCUNE DOMANDE E RISPOSTE PER CAPIRE DI COSA SI TRATTA, COME USARLO E COME INTERPRETARLO

di Walter Bertazzolo



Cari colleghi, questa settimana cercheremo di fare luce su un argomento molto “caldo”, l’utilizzo della PARR nella diagnosi delle neoplasie linfoidi, e lo faremo con il consueto metodo delle domande più frequenti e relative risposte.

## 1) Che cosa significa il termine PARR?

Il termine sta per PCR for Antigen Receptor Rearrangement. In parole semplici è una PCR che ha lo scopo di amplificare alcune porzioni specifiche del DNA dei linfociti prelevati in un tessuto o in un liquido.

## 2) Qual è il principio alla base di questa metodica?

Il principio su cui si basa è legato alla risposta immunitaria dei linfociti agli antigeni. Sia i linfociti T che i linfociti B presentano dei recettori sulla loro superficie che hanno

lo scopo di riconoscere tutti gli antigeni non-self che incontrano. Data la vastità degli antigeni in natura, i linfociti sono predisposti per produrre una quantità enorme di recettori B e T diversi. Per fare ciò “riarrangiano” alcune regioni specifiche del loro DNA che codificano per questi recettori. Il riarrangiamento è in grado di produrre sequenze di DNA numerosissime che codificano per recettori altrettanto numerosi e differenti tra loro, in grado quindi di riconoscere una miriade di antigeni.

### **3) Quindi la PCR va ad amplificare il DNA di queste porzioni di genoma dei linfociti, ma a quale scopo?**

Se immaginiamo una risposta infiammatoria a stimoli esterni (es. batterici, virali, allergeni, ecc.), trattandosi di agenti con un corredo antigenico molto variabile e numeroso, ci saranno diversi cloni di linfociti B e T che verranno attivati, ognuno diretto ad un antigene specifico. I diversi cloni produrranno quindi una progenie di linfociti attivati “policlonali”, ovvero con recettori B e T differenti tra loro. Facendo una PCR da una simile popolazione linfocitaria otterremo quindi prodotti di amplificazione di lunghezza e sequenza diversa tra loro (PARR policlonale). Se immaginiamo invece una neoplasia linfoide, che ha preso origine da una singola cellula, la sua progenie presenterà nella situazione più semplice un solo tipo di recettore in superficie e quindi la PARR da tale neoplasia produrrà solo un tipo di prodotto di amplificazione, denominato quindi monoclonale.

### **4) Quindi in pratica come sfrutto questi concetti?**

In pratica se sospetto una neoplasia linfoide, una PARR eseguita sul tessuto colpito mi darà un risultato monoclonale, mentre se la lesione non è una neoplasia linfoide ma un processo reattivo, otterrò un risultato policlonale. La PARR può quindi aiutarmi a discriminare tra neoplasia linfoide e una flogosi in molti casi complessi, ove le altre metodiche (es. citologia, istologia, fenotipizzazione) hanno dato risultati dubbi.

### **5) Allora, se monoclonale è sinonimo di neoplasia e policlonale di popolazione infiammatoria, perché non uso solo la PARR per diagnosticare un linfoma o una leucemia linfoide, senza dover ricorrere a citologia, istologia ecc.?**

Perché purtroppo, come per qualsiasi altro test diagnostico, la sensibilità e la specificità non sono assolute. Esistono cioè delle eccezioni alla regola di massima. Ci sono alcune condizioni non neoplastiche che mimano una proliferazione mono-

clonale tumorale: ad esempio in corso di ehrlichiosi, di reazioni di ipersensibilità o degli infiltrati linfocitari negli istiocitomi in regressione. Viceversa ci sono situazioni in cui di fronte ad una neoplasia linfoproliferativa si ottengono risultati non significativi, per lo più per problematiche tecniche di specificità dei primer utilizzati. Per tale ragione non andrebbe mai usata da sola ma come ausilio diagnostico insieme alle altre procedure più diffuse. Secondo alcuni studi, la specificità della PARR è superiore al 90% ma la sensibilità è ben al di sotto dell'80%.

## **6) Posso usarla per fare una diagnosi di fenotipo, ovvero sapere se la neoplasia è B o T ?**

Non è la metodica d'elezione, sebbene nella maggior parte dei casi le neoplasie B e T sono clonali per il recettore specifico, ma ci sono eccezioni in particolare per le neoplasie a fenotipo B, che possono risultare clonali per il T-cell Receptor. Per cui per la diagnosi di fenotipo bisogna necessariamente ricorrere a citofluorimetria, immuno-citochimica o immuno-istochimica.

## **7) Ma come procedo in pratica se voglio richiedere una PARR?**

Semplicemente basta campionare l'organo o il fluido di interesse e inviare il materiale con i seguenti accorgimenti:

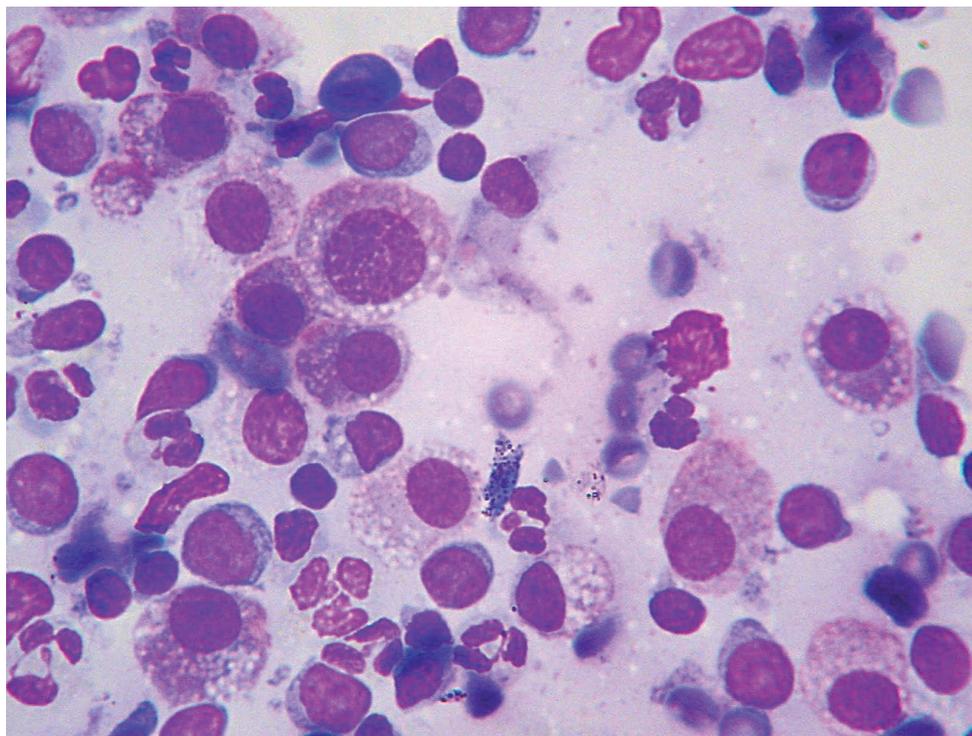
- Fluidi: basta inviarli in una provetta priva di anticoagulanti.
- Campioni citologici: si può eseguire su strisci sia non colorati che già colorati.
- Frammenti biotici: anche se si può fare su frammento fissato in formalina o addirittura su sezioni già processate per l'istologia, tutti i trattamenti chimici possono dare non pochi problemi tecnici, favorendo risultati falsi (soprattutto negativi). Per cui è consigliabile inviare un frammento prelevato a fresco, mantenuto umido con una garza imbevuta di fisiologica sterile e posto a contatto con alcuni siberini per mantenerlo refrigerato (sarebbe ancora meglio congelato, ma non è facile organizzare un trasporto in ghiaccio secco).

Per chi fosse interessato ad approfondire l'argomento segnaliamo questa recente review: *Keller et al. Clonality testing in veterinary medicine: a review with diagnostic guidelines. Veterinary Pathology; 2016; 53: 711-725.*



## SPERANZA PER I MASTOCITOMI DEL CANE IN STADIO IV

di Laura Marconato



Il mastocitoma è il tumore cutaneo più comune nel cane. In molti casi la chirurgia è curativa; tuttavia, in presenza di metastasi, l'approccio terapeutico è più complesso e si devono prendere in considerazione numerose variabili per scegliere la strategia migliore.

La presenza di metastasi a distanza, valutabile mediante diagnostica per immagini e citologia degli organi target, è stata storicamente associata ad una prognosi infausta, con tempi di sopravvivenza di 2-3 mesi, indipendentemente dalla scelta terapeutica messa in atto.

Grazie alla collaborazione tra oncologi medici e patologi italiani è stato condotto uno studio prospettico su 45 cani con mastocitoma in stadio IV (quindi con meta-

stasi a distanza), recentemente pubblicato su *Veterinary and Comparative Oncology*, la rivista di riferimento per l'oncologia veterinaria:

*(Pizzoni S, Sabattini S, Stefanello D, Dentini A, Ferrari R, Dacasto M, Giantin M, La-ganga P, Amati M, Tortorella G, Marconato L.) – Features and prognostic impact of distant metastases in 45 dogs with de novo stage IV cutaneous mast cell tumours: A prospective study.*

Vet Comp Oncol. 2017 Feb 23. doi: 10.1111/vco.12306).

Studiando le caratteristiche di questo gruppo di cani, abbiamo evidenziato alcuni fattori prognostici positivi, che si accompagnano ad una più lunga sopravvivenza, contrariamente a quanto fino ad ora riportato.

Nello specifico, cani asintomatici con mastocitoma cutaneo di dimensioni inferiore a 3 cm e senza infiltrazione del midollo osseo sono candidati per una terapia multimodale, volta ad ottenere il controllo locale e a distanza (quindi chirurgia e/o radioterapia e terapia medica con chemioterapia tradizionale e/o farmaci a bersaglio). Abbiamo inoltre evidenziato che una piccola percentuale di cani (10%) mostra metastasi a distanza senza il coinvolgimento del linfonodo satellite: questi soggetti sembrano avere una sopravvivenza decisamente più lunga.

Da questo studio emerge come un'attenta valutazione del bilancio di estensione (staging) sia fondamentale per definire la prognosi: in particolare, è sempre opportuno ricorrere alla valutazione citologica ed istopatologica non solo del tumore primitivo, ma anche del linfonodo regionale, oltre che alla valutazione citologica di fegato, milza e midollo osseo.

Un piccolo passo avanti!

## **BIOPSIE OSSEE: QUANDO IL LAVORO DI SQUADRA È ESSENZIALE**

Intervista alla dott.ssa Raffaella Bergottini

Cari colleghi, in questo nuovo Blog, la Dr.ssa Raffaella Bergottini, consulente di istologia generale del laboratorio La Vallonea, ci racconta la sua recente esperienza all'istituto ortopedico Rizzoli di Bologna, centro di eccellenza internazionale per le patologie ortopediche nell'uomo, dove ha partecipato al corso annuale di "Musculoskeletal pathology".

### **D: Raffaella, qual è l'insegnamento più importante che porti a casa da questo corso?**

R: Sicuramente il fatto che la diagnosi ortopedica richiede un eccellente lavoro di staff che coinvolge il clinico, il radiologo ed il patologo. Il corso era fortemente orientato all'approccio multidisciplinare e per 5 giorni i relatori hanno ricordato ai colleghi radiologi, ortopedici, oncologi e patologi quanto sia importante la comunicazione tra figure professionali. La cosa mi ha particolarmente colpita, perché solitamente, in medicina umana, i diversi specialisti operano tutti nello stesso contesto – ospedali o case di cura – e non immaginavo ci fossero problemi di comunicazione tra loro. Ma evidentemente è necessario ribadire che le interazioni devono essere sempre il più strette possibile.

### **D: Ma questo riguarda solo l'ambito ortopedico?**

R: Certamente no. Non si può dimenticare che il patologo non vede mai l'animale, ma solo una o più sezioni bidimensionali che vanno da pochi millimetri a 2 x 3 cm al massimo, e in tutti i casi fornirgli una anamnesi il più completa possibile garantisce una maggiore probabilità di ottenere una diagnosi corretta ed esaustiva.

Diciamo però che il tessuto osseo richiede una particolare completezza di informazioni cliniche e radiografiche, per più di un motivo: i campioni sono spesso di piccole dimensioni e le lesioni sono estremamente eterogenee, per cui la probabilità di prelievi poco rappresentativi è elevata indipendentemente dall'abilità dell'operatore che effettua la biopsia. Inoltre gli aspetti diagnostici non sono esclusivamente istologici: è importante valutare la modalità di crescita, il tipo di reazione del tessuto circostante, l'eventuale coinvolgimento dei tessuti molli e/o articolari. Ci sono poi spesso lesioni sovrapposte: fratture e reazioni periostali insorte secon-

dariamente su processi patologici neoplastici e non. Insomma, in tutti i casi fornire una anamnesi completa è davvero fondamentale.

### **D: Che fare allora? Qual è il modo corretto per inviare una biopsia ossea?**

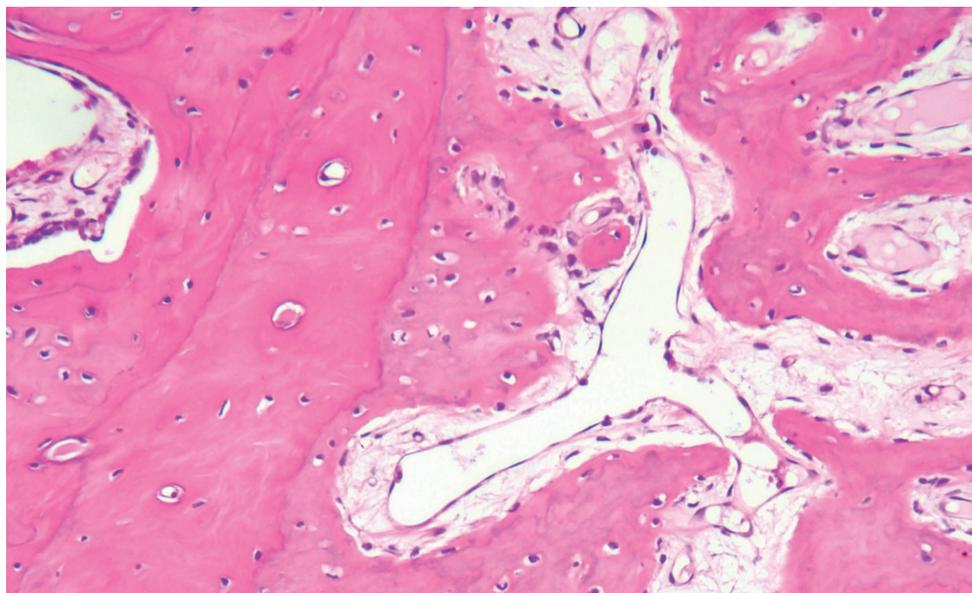
R: Prima di tutto ottenere prelievi rappresentativi della lesione: non troppo superficiali ma nemmeno troppo profondi. Sembra un concetto logico e banale, ma in pratica non è poi così semplice. Il numero delle biopsie inviate e le loro dimensioni devono essere quanto maggiori possibile. Non c'è una regola fissa ma diciamo che eseguire meno di 3 biopsie con ago jamshidi spesso non garantisce la presenza di materiale diagnostico. D'altro canto eseguire un numero elevato di biopsie può essere problematico per il clinico e anche per l'integrità dell'animale.

In secondo luogo, per l'appunto, è importante lavorare in squadra! Descrivere la lesione macroscopica e i suoi aspetti in diagnostica per immagini, informare il patologo della sua progressione, e includere una lista di diagnosi differenziali che sembrano clinicamente più probabili.

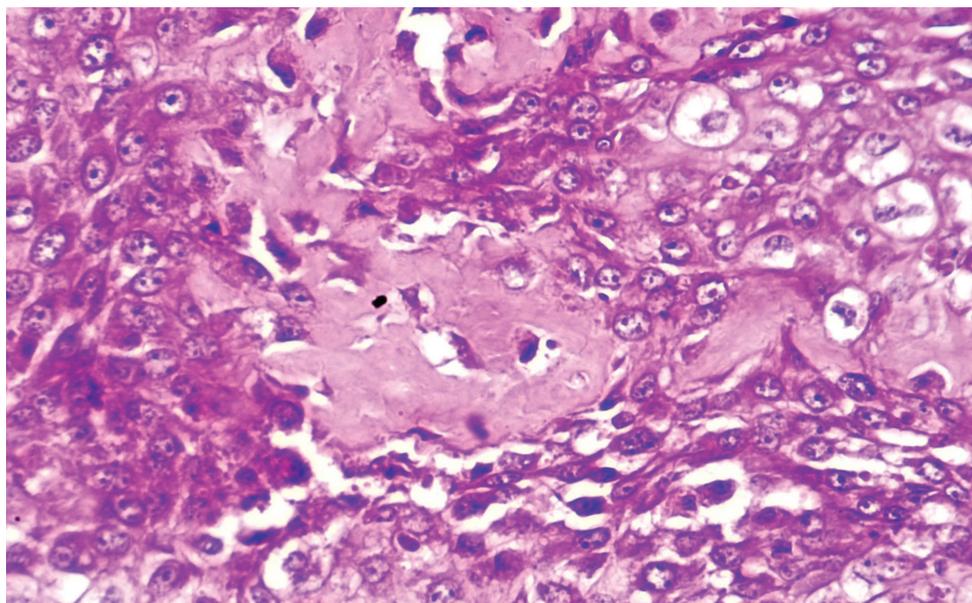
Una cosa che non succede spesso ma che idealmente andrebbe fatta sempre è inviare contestualmente anche tutte le immagini (RX, TC o MRI): questo permette al patologo di capire se il materiale sui prelievi è rappresentativo o no e gli consente di valutare il quadro istologico insieme agli altri aspetti diagnostici già descritti. Il consulto con radiologi esperti è poi molto importante. Spesso questo aspetto è sottovalutato dai clinici, in alcuni casi criticato in quanto ritengono che la procedura biptica debba essere sempre e necessariamente sufficiente per giungere ad una diagnosi, e talvolta si "scandalizzano" allorché il patologo chiede loro informazioni relative alla diagnostica per immagini. Ebbene i veterinari clinici devono comprendere che questa è una procedura normale negli ospedali umani, per cui lo deve diventare anche nella nostra pratica clinica quotidiana.

Solo facendo lavoro di squadra e unendo le informazioni cliniche, radiologiche e istopatologiche si può arrivare a formulare una diagnosi accurata !

Note: nelle due immagini istopatologiche che seguono è riportato un esempio di patologia non neoplastica (osteopatia ipertrofica) ed uno di patologia neoplastica (osteosarcoma condroblastico): in assenza un'adeguata descrizione clinica ed un corretto campionamento, sono di difficile distinzione.



*Figura 1 – Osteopatia ipertrofica.*



*Figura 2 – Osteosarcoma condroblastico.*

# LEISHMANIOSI CANINA: COME SFRUTTARE AL MASSIMO GLI ESAMI DI LABORATORIO

di Ugo Bonfanti & Walter Bertazzolo

Cari colleghi, abbiamo colto una duplice occasione per presentarvi un aggiornamento riguardo l'utilizzo degli esami di laboratorio per la diagnosi e il monitoraggio della leishmaniosi canina.

È infatti stata da poco pubblicata una esaustiva review sul prestigioso *Veterinary Clinical Pathology*, da noti autori italiani (Paltrinieri et al; *Vet Cli Pathol* 2016, 45: 552-578), in cui vengono presi in considerazione i diversi strumenti diagnostici a nostra disposizione e le strategie più corrette per una stadiazione clinica e per il controllo nel tempo dei pazienti in terapia.

Abbiamo quindi preparato due documenti che vi alleghiamo, in cui riassumiamo le linee guida riportate nella suddetta review. Siamo certi che troverete i due allegati estremamente utili per la vostra pratica clinica.

## INTRODUZIONE

La leishmaniosi è una diffusa e frequente malattia infettiva protozoaria trasmessa da un insetto flebotomo, sostenuta da *Leishmania infantum*, associata a differenti presentazioni cliniche ed a notevole morbilità e – nonostante terapie appropriate e mirate – a mortalità rilevante. L'importanza della patologia è legata anche al potenziale carattere zoonosico, rappresentando pertanto il cane un potenziale serbatoio di riserva del parassita per l'uomo.

La finalità della presente trattazione è descrivere le principali alterazioni di laboratorio che si possono identificare in corso di leishmaniosi canina, e prendere in rassegna i test di laboratorio utili al clinico per inquadrare accuratamente la patologia sia da un punto di vista diagnostico che di monitoraggio terapeutico.

Premessa essenziale è chiarire alcune definizioni dello “stato” clinico del paziente. Infatti, in corso di leishmaniosi i pazienti possono essere suddivisi in tre stadi in base ad una combinazione di segni clinici e rilievi di laboratorio in “esposti”, “infetti” e “malati”.

- **Esposti:** pazienti clinicamente normali – o con segni clinici riconducibili ad altre malattie – che posseggono titoli anticorpali negativi o bassi (inferiori di 4 volte il



titolo anticorpale “soglia” – o valore soglia – del laboratorio), che sono negativi alla ricerca del parassita mediante citologia e /o PCR, ma che vivono, o hanno vissuto, in aree geografiche in cui è confermata la presenza del flebotomo.

- **Infetti:** pazienti clinicamente normali – o con segni clinici riconducibili ad altre malattie – senza alterazioni di laboratorio, ma in cui è stata dimostrata la presenza del parassita nei tessuti mediante identificazione diretta (es. citologia e/o PCR). In questi pazienti i titoli anticorpali risultano negativi o bassi (inferiori di 4 volte il titolo anticorpale “soglia” del laboratorio”) ma non sono presenti alterazioni clinico-patologiche riferibili a leishmaniosi.
- **Malati:** pazienti infetti, in cui la presenza del parassita è dimostrata mediante citologia e/o PCR, indipendentemente dal titolo anticorpale, o con titolo anticorpale uguale o superiore di 4 volte il valore “soglia” del laboratorio. In questi soggetti si identificano segni clinici e/o alterazioni clinico patologiche riferibili a leishmaniosi.
- **Gravemente malati:** pazienti in cui si identificano gravi condizioni cliniche quali nefropatia proteinurica, insufficienza renale cronica ed affetti da problematiche concomitanti, correlate o meno a leishmaniosi, quali patologie oculari gravi ed artropatie che richiedano terapie immunosoppressive. In questo stadio rientrano anche pazienti con patologie concomitanti, quali coinfezioni, patologie neoplastiche, endocrinopatie e malattie metaboliche, nonché quei soggetti che non rispondono adeguatamente alle comuni terapie leishmanicide.

### **Alterazioni di laboratorio in corso di leishmaniosi**

Accanto a segni clinici più o meno caratteristici, possono essere presenti alterazioni di laboratorio riconducibili a leishmaniosi e che talvolta possono anticipare segni clinici, in grado pertanto di indurre il sospetto della malattia protozoaria nel paziente. Inizieremo col trattare le alterazioni generiche relative ai profili emato-biochimici, per poi dedicarci ai test più specifici di infezione.

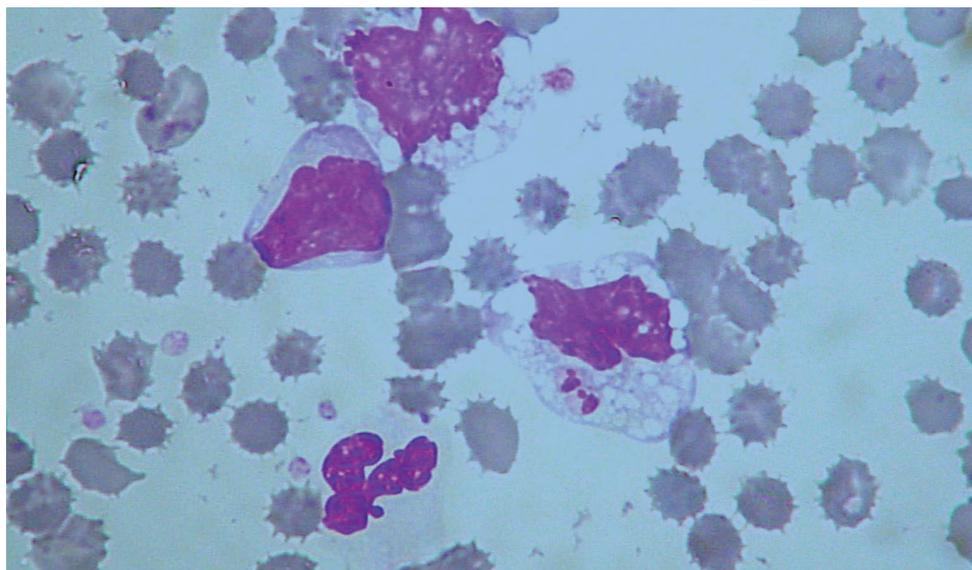
### **ALTERAZIONI EMATOLOGICHE**

Le alterazioni ematologiche in corso di leishmaniosi sono non specifiche. In particolare il rilievo più comune consiste in un’anemia da “infiammazione cronica”, moderata, non rigenerativa, normocitica e normocromica.

Tale anemia può essere anche la conseguenza di carenza di eritropoietina nel caso in cui sia presente una concomitante insufficienza renale cronica. In alcuni casi può essere presente anche una sottostante causa immunomediata (es. anemia emolitica secondaria).

L'infiammazione sistemica spesso presente è causa di una neutrofilia matura, associata o meno a monocitosi, linfocitosi o linfopenia, e occasionalmente eosinofilia.

In una percentuale molto ridotta di casi possono essere presenti amastigoti di leishmania nei neutrofili circolanti. Infine, il rilievo di una lieve / moderata trombocitopenia rappresenta evenienza relativamente comune, conseguenza spesso di un fenomeno immunomediato o a seguito di azione diretta del parassita a livello midollare (ridotta trombopoiesi). In caso di trombocitopenie gravi sono spesso presenti co-infezioni (ad esempio con ehrlichiosi).



*Figura 1 – Esempio di parassitemia: in questo striscio ematico di cane sono presenti monociti contenenti amastigoti di Leishmania fagocitatis, evento insolito e spesso associato a grave infestazione midollare.*

Alcuni autori hanno segnalato che la determinazione citofluorimetrica su sangue periferico del rapporto dei linfociti CD4/CD8 in pazienti affetti da leishmaniosi, può avere rilevanza clinica.

La riduzione della risposta Th1 (cellulo mediata), e di conseguenza un'aumentata predisposizione alla comparsa di segni clinici collegati a leishmaniosi, è spesso associata ad un basso rapporto CD4/CD8 dovuto ad una riduzione del numero dei linfociti CD 4+: è più frequente pertanto che segni clinici si identifichino in pazienti con basso rapporto CD4/CD8. A motivo peraltro della notevole variabilità individuale, tale rapporto viene consigliato più per il monitoraggio terapeutico rispetto al suo utilizzo per la diagnosi, in soggetti con segni clinici potenzialmente riferibili a questa malattia protozoaria. Questo test viene eseguito su sangue periferico senza particolari accorgimenti tecnici, se non quello di poter analizzare un campione relativamente fresco (entro 24 ore dal prelievo).

## **ALTERAZIONI del MIDOLLO OSSEO**

Le alterazione ematologiche si accompagnano ad anomalie di differente entità a carico del midollo osseo. Può identificarsi un'ipoplasia eritroide associata talvolta ad iperplasia mieloide con incremento del rapporto M:E, riferibile ad una risposta alla malattia cronica. Può essere presente un'inflammatione midollare concomitante con aumento dei macrofagi che possono contenere amastigoti di leishmania, aumento dei neutrofili, plasmacitosi e linfocitosi. La serie megacariocitica può presentare aspetti di iperplasia o di ipoplasia.

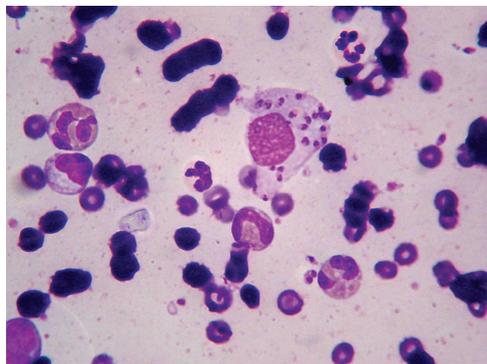
In alcune occasioni possono identificarsi caratteri di displasia (dismielopoiesi) in cui – accanto solitamente a citopenie periferiche – si possono identificare ipercellularità del midollo osseo con displasia a carico di differenti linee cellulari.

Occorre peraltro sottolineare come la presenza di dismielopoiesi non sia riferibile sempre e solo a leishmaniosi a meno di identificate amastigoti a livello midollare.

La presenza di sindromi mielodisplastiche deve pertanto essere valutata accuratamente mediante sierologia o valutazione del midollo mediante citologia o PCR.

A questo proposito, la valutazione del midollo osseo permette spesso di emettere diagnosi di leishmaniosi nel caso in cui si identifichi il parassita. Secondo alcuni inoltre autori la carica parassitaria permette di differenziare tra un animale solamente infetto (carica parassitaria bassa) ed uno malato (carica parassitaria elevata), anche se questa associazione non è condivisa da tutti gli autori (sono talvolta possibili infatti concentrazioni parassitarie elevate a dispetto di segni clinici estremamente scarsi).

L'esame del midollo osseo per la ricerca dei parassiti è, come vedremo più avanti, uno step molto importante nella ricerca diretta di Leishmania.



*Figura 2 – Esempio di infestazione midollare da Leishmania: il campione appare ipocellulare ma è ben evidente la presenza di amastigoti fagocitati da un macrofago e liberi sul fondo.*

## **ANOMALIE della COAGULAZIONE**

Le anomalie della coagulazione non sono molto frequenti in corso di leishmaniosi. Prolungamenti dei tempi di coagulazione possono essere la conseguenza di fenomeni di coagulazione vasale disseminata, peraltro poco comune.

Di contro, una ipercoagulabilità può rappresentare la conseguenza di perdita di anti-trombina III secondaria ad eventuali nefropatie proteino-disperdenti. Ipercoagulabilità può verificarsi anche per la sindrome da iperviscosità conseguenza di iperglobulinemia.

## **ALTERAZIONI BIOCHIMICHE**

La presentazione clinica da pazienti affetti da leishmaniosi può essere particolarmente variabile, come le anomalie biochimiche che possono rappresentare la conseguenza di alterazioni epatorenali o essere la conseguenza dei rilevanti fenomeni infiammatori che possono verificarsi a seguito della malattia infettiva.

### **Anomalie della funzionalità renale**

La deposizione di immunocomplessi a livello glomerulare è responsabile della nefropatia proteinurica. La conseguente insufficienza renale cronica si caratterizza per glomerulosclerosi, ipertensione e nefrite tubulointerstiziale. Come per ogni insufficienza renale cronica, anche in corso di leishmaniosi risulta pertanto necessario monitorare creatinina e urea, proteinuria e peso specifico urinario.

La valutazione della creatinina sierica rappresenta pertanto il test attualmente più indicato in corso di leishmaniosi per valutare la riduzione della GFR, anche se

sono oggetto di studio altri biomarker più precoci quali cistatina C e SDMA, che peraltro, al momento, non hanno dimostrato un reale valore aggiunto rispetto alla valutazione della creatininemia.

Risulta sempre necessario anche eseguire l'esame delle urine. In particolare il peso specifico urinario tende a diminuire a seguito della ridotta capacità di concentrazione delle urine da parte dei reni e la valutazione del sedimento deve essere effettuata sia per valutare eventuale cilindruria, sia al fine di verificare eventuali infezioni urinarie che possono complicare la leishmaniosi, ed alterare la valutazione della proteinuria.

A questo proposito, la valutazione della proteinuria è un test assolutamente necessario in corso di leishmaniosi, poiché la proteinuria stessa può essere responsabile della progressione dell'insufficienza renale cronica e può essere pertanto necessario controllarla con apposite terapie.

Le urine dovrebbero essere raccolte mediante cistocentesi, anche se un primo screening potrebbe essere fatto su urine raccolte mediante minzione spontanea, in caso di sedimento inattivo. La presenza di tracce di proteine alla striscia reattiva, in concomitanza ad un basso peso specifico urinario, oppure se presente una proteinuria evidente alla striscia reattiva indipendentemente dal peso specifico, rappresentano evidenze inconfutabili di proteinuria. In tal caso la proteinuria deve essere quantificata mediante PU/CU: valori superiori a 0,5 sono riferibili a proteinuria, mentre valori compresi tra 0,2 e 0,5 sono considerati "borderline" e necessitano di controllo successivo.

La valutazione delle urine mediante elettroforesi in base al peso molecolare (SDS-AGE) rappresenta un test diagnostico molto importante, utile a fornire indicazioni precoci relative alla localizzazione del danno tubulare o glomerulare. È stato dimostrato come la maggior parte dei cani leishmaniotici abbia proteinurie miste, tubulo-glomerulari. L'SDS-AGE si correla bene agli esiti di eventuali biopsie renali.

## **Anomalie proteiche**

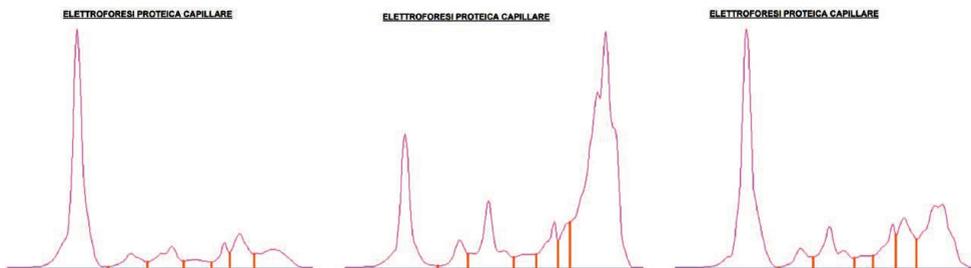
I pazienti con leishmaniosi clinicamente manifesta sintetizzano numerose proteine di natura flogistica, anticorpi compresi. Elettroforesi delle sieroproteine e misurazione delle proteine di fase acuta (APP) sono di supporto nella diagnosi della malattia e risultano utili anche per monitorare l'evoluzione della stessa o la risposta alla terapia.

Le proteine totali e le globuline tendono ad incrementare proporzionalmente alla gravità dei segni clinici, ad eccezione delle albumine che rappresentano una proteina di fase acuta negativa, e che possono inoltre essere perse in corso di nefropatia proteino-disperdente.

Il tipico quadro elettroforetico in corso di leishmaniosi si caratterizza per ipoalbuminemia, incremento delle alfa2 globuline (ove migrano le proteine di fase acuta) ed ipergammaglobulinemia policlonale, conseguente ad incremento degli anticorpi circolanti, e degli immunocomplessi. Occasionalmente si identificano incrementi delle beta globuline. La gammopatia è spesso policlonale, ma non raramente possono identificarsi gammopatie oligoclonali e raramente monoclonali. Le APP rappresentano un importante biomarker di infiammazione, e per questo motivo tendono ad essere estremamente elevate in corso di leishmaniosi. Tra le APP che incrementano sono segnalate proteina C reattiva (CRP), ceruloplasmina (Cp), aptoglobina (Hp), siero amiloide-A (SAA) e ferritina. Parimenti, tendono a diminuire proteine di fase acuta negativa: albumine – come già riportato – ma anche transferrina e PON-1.

Occorre infine sottolineare come le alterazioni delle APP non siano diagnostiche di leishmaniosi clinicamente manifesta: possono incrementare anche in pazienti infetti ma senza segni clinici, oppure in pazienti con altre malattie infettive differenti o da numerose altre condizioni infiammatorie e neoplastiche.

Nelle seguenti immagini vi mostriamo tre esempi di tracciato elettroforetico: il primo in un cane sano; il secondo in un cane con leishmaniosi conclamata e poliartrite, grave ipo-albuminemia, iper-globulinemia e gammopatia policlonale; infine il terzo appartenente allo stesso cane dopo alcuni mesi dalla terapia leishmanicida.

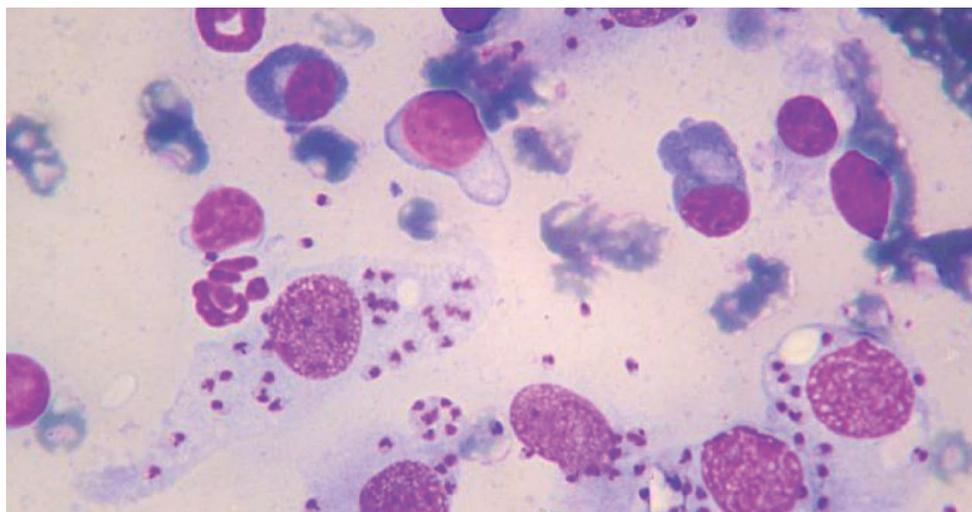


## Test per la diagnosi eziologica di Leishmaniosi

I test per l'identificazione di infezione da *Leishmania* si dividono in test diretti ed indiretti.

Test diretti: queste metodiche permettono l'identificazione del parassita mediante tecniche microscopiche (citologia, istologia, immuno-istochimica) o di frammenti del suo genoma (es. Polymerase Chain Reaction: PCR).

**Citologia:** la diagnosi certa di infezione è garantita dall'individuazione di amastigoti in campioni di tessuti infetti. Va sottolineato che la visualizzazione del parassita non indica necessariamente una condizione di malattia conclamata, sebbene solitamente l'individuazione di amastigoti al microscopio sia associato a patologia, ed il loro numero alla carica parassitaria nel tessuto infettato. Al contrario, la mancata individuazione citologica del parassita non può escludere un'infezione in corso; in caso di persistente sospetto clinico è consigliabile ricorrere pertanto a metodiche di ricerca di tipo molecolare (PCR), molto più sensibili. Gli amastigoti possono essere individuati in qualsiasi tessuto o fluido biologico, e anche all'interno di neoplasie. Ogni volta che ci si trova di fronte a lesioni sospette, superficiali o profonde, è consigliabile il campionamento citologico. Tuttavia ci sono tessuti in cui è molto più elevata la probabilità di individuare il parassita: ci riferiamo al midollo osseo ematopoietico e agli organi linfoidi (linfonodi in particolare).



*Figura 3 – Esempio di campione citologico linfonodale in cui si riconoscono numerosissimi amastigoti di Leishmania, oltre a cellule linfoidi e macrofagi.*

**Istologia ed immuno-istochimica:** gli amastigoti possono essere individuati nei tessuti infetti, tuttavia la loro identificazione è molto meno agevole che in citologia. Per tale ragione, in caso di lesioni sospette, la diagnosi definitiva richiede il ricorso alle tecniche di immuno-istochimica per accertare la presenza degli antigeni parassitari.

Sui campioni istologici è inoltre possibile eseguire tecniche di biologia molecolare come la PCR, sebbene siano da preferirsi altri substrati non fissati in formalina.

**PCR:** diverse varianti di PCR sono disponibili, tutte però hanno lo scopo di individuare piccoli frammenti specifici di genoma parassitario.

Si possono usare PCR qualitative (convenzionale e “nested” a maggiore sensibilità) che conferiscono esclusivamente risultati “negativo vs positivo”, oppure di tipo quantitativo che permettono di quantificare le copie di DNA amplificate.

Queste ultime quindi sono utili per quantificare la carica parassitaria e possono essere utilizzate nel monitoraggio delle terapie: conoscendo la carica iniziale si possono fare controlli seriali nel tempo sul medesimo tessuto per verificare l’effettiva riduzione della carica parassitaria stessa. Possono essere utilizzati molti tessuti e fluidi biologici come substrati per la ricerca mediante PCR, inclusi sangue, sangue midollare, urine, tamponi salivari/oculari e strisci citologici. Tuttavia, per avere una sensibilità diagnostica ottimale si consiglia di utilizzare preferenzialmente campioni di midollo osseo (sangue midollare in EDTA) e strisci linfonodali (normali strisci ottenuti mediante FNA convenzionale, colorati o tal quali).

Non sono necessari particolari accorgimenti di conservazione ed invio del materiale, in quanto il DNA è molto stabile.

**Test indiretti:** questi metodi non permettono di individuare direttamente gli agenti eziologici, ma mettono in evidenza alcune alterazioni clinico-patologiche specifiche indotte dall’infezione. In particolare si ricorre all’identificazione di anticorpi specifici prodotti dalla risposta immunitaria contro il parassita (test sierologici). Va ricordato che gli anticorpi contro la Leishmania iniziano a comparire in maniera significativa solo dopo 3-6 mesi dall’infezione.

Ci sono diversi tipi di test sierologici: quelli rapidi, basati su metodiche ELISA o immuno-cromatografiche, facili da usare anche in sede ambulatoriale, ma che possono solo dare risultati del tipo “positivo vs negativo” senza poter specificare il titolo anticorpale presente. Questi test hanno una sensibilità diagnostica piuttosto bassa (soprattutto in pazienti con titoli bassi), mentre la loro positività si associa solitamente a titoli elevati e quindi a stadi per lo più patologici (buona specificità).



I test quantitativi possono utilizzare la metodica dell'immunofluorescenza indiretta (IFI) o dell'ELISA.

La prima ha lo svantaggio di essere una metodica quantificabile in maniera soggettiva attraverso la valutazione di vetrini al microscopio a fluorescenza, ed è pertanto operatore dipendente. Per tale ragione è consigliabile, in caso di controlli seriali, utilizzare sempre lo stesso laboratorio. Inoltre per valutare effettivi cambiamenti di titolo nel tempo, si devono prendere come significativi solo variazioni pari almeno a 4 volte il titolo iniziale (in più o in meno).

La seconda invece è quantificabile in maniera oggettiva mediante lettori ELISA e non è quindi operatore dipendente. Entrambi i metodi sierologici quantitativi presentano svantaggi e vantaggi: titoli bassi sono comuni in pazienti esposti ma non infetti o malati, e devono sempre essere interpretati con cautela. Titoli elevati sono invece più facilmente associati a reale infezione/malattia. Noi consigliamo tuttavia di considerare i test sierologici come esami di screening di base e di confermarli mediante ricerca diretta prima di emettere una diagnosi definitiva e di iniziare le terapie leishmanicide specifiche.

### **Come monitorare la terapia ed il follow-up mediante gli esami di laboratorio**

I test di laboratorio sono in questa fase indirizzati a monitorare eventuali effetti collaterali della terapia intrapresa ed a controllare le condizioni cliniche dei pazienti, oltre allo stato dell'infezione.

- Gli effetti tossici (renali, cardiaci, pancreatici) degli antimoniali sono estremamente rari e pertanto da monitorare solo in pazienti selezionati o a rischio. L'allopurinolo invece può essere responsabile della formazione di cristalli o di uroliti di xantina. Pertanto, le urine di pazienti a cui viene somministrato allopurinolo per periodi prolungati devono essere periodicamente controllate. Raramente però si osserva la formazioni di uroliti voluminosi che necessitano un intervento medico/chirurgico.
- A motivo del polimorfismo delle presentazioni cliniche dei soggetti affetti da leishmaniosi, è impossibile definire a priori quali analisi di laboratorio dovrebbero essere periodicamente controllate. In linea generale dovrebbe essere monitorato lo stato di funzionalità renale e lo stato infiammatorio. Pertanto consigliabile controllare periodicamente creatinina sierica e proteinuria semiquantitativa (striscette) e quantitativa (PU/CU), trattandole seguendo le linee guida IRIS ([www.iris-kidney.com](http://www.iris-kidney.com)). Relativamente allo stato infiammatorio risulta opportuno controllare proteine totali, elettroforesi delle sieroproteine ed APP (in particolare CRP ed SAA).

- Le proteine di fase acuta hanno il vantaggio di ritornare rapidamente alla normalità già dopo 15-30 giorni dalla terapia.
- L'elettroforesi richiede più tempo: non ha senso ricontrollarla prima di un mese dall'inizio della terapia, in quanto la normalizzazione del tracciato in caso di risposta efficace, richiede almeno 3-4 mesi.
- In caso di persistenza di un quadro infiammatorio a dispetto della terapia, va presa in considerazione l'eventuale presenza di altre malattie infiammatorie/infezzive o anche neoplastiche concomitanti o un mancato successo terapeutico.
- Va ricordato che la risposta terapeutica ai diversi farmaci ha una velocità differente: l'antimoniato di N-metilglucamina è più rapido ad agire della miltefosina; nel caso si selezionasse quest'ultima, i tempi sopra descritti possono risultare più dilatati.
- Lo stato parassitologico dovrebbe essere monitorato mediante titoli anticorpali (sierologia) o mediante la valutazione diretta della presenza parassita. A questo proposito, titoli anticorpali post terapia tendono a diminuire dopo 30 giorni, in soggetti malati, con buona risposta alla terapia, anche se la maggior parte dei pazienti che rispondono in maniera adeguata possono iniziare a manifestare riduzioni consistenti solo dopo 6 mesi o più. Occorre inoltre ricordare come in soggetti che vivono in aree endemiche la completa normalizzazione del titolo anticorpale spesso non sia possibile. La finalità sarebbe quella di raggiungere titoli anticorpali inferiori di 4 volte il titolo anticorpale "soglia" – o valore soglia – del laboratorio (soggetti "esposti"). Idealmente, al fine di valutare la completa efficacia della terapia (eliminazione del parassita) sarebbe opportuno impiegare test molto sensibili quali la PCR quantitativa su midollo osseo, milza, linfonodi, che rappresentano peraltro metodiche un po' più invasive e non sempre percorribili, specie in pazienti in ottime condizioni di salute. Nella pratica clinica si ricorre pertanto ancora alla sierologia o eventualmente alla PCR quantitativa su sangue periferico (sebbene sarebbe più indicato il sangue midollare) che dovrebbe manifestare una riduzione "consistente" delle copie di parassita dopo 3-6 mesi dall'inizio della terapia ed una negativizzazione completa in 12 mesi.

## Bibliografia

Noli C. et al: An update on the diagnosis and treatment of canine leishmaniosis caused by *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*). *Vet Journal* (2014); 202: 425-435.

Paltrinieri S. et al: Laboratory tests for diagnosing and monitoring canine leishmaniasis. *Vet Clin Pathol* (2016); 45: 552-578.



Roura X. et al: Prognosis and monitoring of leishmaniasis in dogs: A working group report. Vet Journal (2013); 198: 43-47.

Solano-Gallego L. et al: LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniasis. Parasites & Vectors (2011); 4: 86-101.

## Tabella riassuntiva

Tipo di esame	Utilità diagnostica	Utilità nel monitoraggio	Annotazioni
<b>Esami emato-biochimici di base e urine</b>	Necessari per inquadrare il caso clinico Necessari per la stadiazione del paziente * Necessari per instaurare terapia di supporto (es: per controllo proteinuria, azotemia, ecc.)	Necessari per valutare la corretta risposta terapeutica (involuzione delle alterazioni presenti alla diagnosi)	Gli esami di base andrebbero effettuati sempre prima di iniziare ogni protocollo terapeutico al fine di un corretto monitoraggio
<b>Elettroforesi</b>	Necessaria per la diagnosi di sospetto	Necessaria per valutare la risposta a terapie Ritorno alla normalità nell'arco di alcuni mesi	La presenza di elettroforesi normale esclude con buona probabilità una leishmaniosi, tranne che in caso di infestazioni molto recenti o di soggetti gravemente immuno-compromessi
<b>Coagulazione</b>	Non rilevante	Non rilevante	Può essere alterata nei soggetti GRAVEMENTE MALATI
<b>Test sierologici rapidi</b>	Utili per screening di base	Non utili	Attenzione a frequenti possibilità di falsi negativi Positività sierologica da confermarsi mediante test diretti
<b>Test sierologici quantitativi (IFI, ELISA)</b>	Utili per screening di base	Poco rilevanti La sieropositività tende a normalizzarsi dopo 6-12 mesi dalla risposta terapeutica	"Malattia" solitamente associata a titoli elevati "Esposizione" ed "Infestazione" senza malattia solitamente associata a titoli bassi Positività sierologica da confermarsi mediante test diretti
<b>Ricerca diretta: Citologia</b>	Positività citologica decisiva per diagnosi di infezione Quasi sempre associata a malattia più o meno conclamata Campioni più utili: FNA linfonodali, midollo osseo, lesioni primarie (es: noduli cutanei)	Utilizzabile ma meno pratica degli altri metodi diretti ed indiretti	Possibile positività in soggetti con infestazione localizzata (es: cute) ma non ancora sistemica Sensibilità diagnostica non ottimale (es: in corso di carica parassitaria bassa) Se il sospetto di leishmaniosi è fondato ma la citologia è negativa passare a test più sensibili (PCR)
<b>Ricerca diretta: PCR</b>	Positività PCR indicativa di infezione, non necessariamente malattia Tessuti più utili: midollo osseo, FNA linfonodali, tamponi salivari/oculari	Utilizzabile se quantitativa (diminuzione delle copie di DNA rispetto a diagnosi)	Valutare tipo di PCR da richiedere in base a esigenze caso clinico (qualitativa vs quantitativa)
<b>Ricerca diretta: immunohistochimica</b>	La positività alla ricerca del parassita in una lesione è indicativa di infestazione		

Legenda:

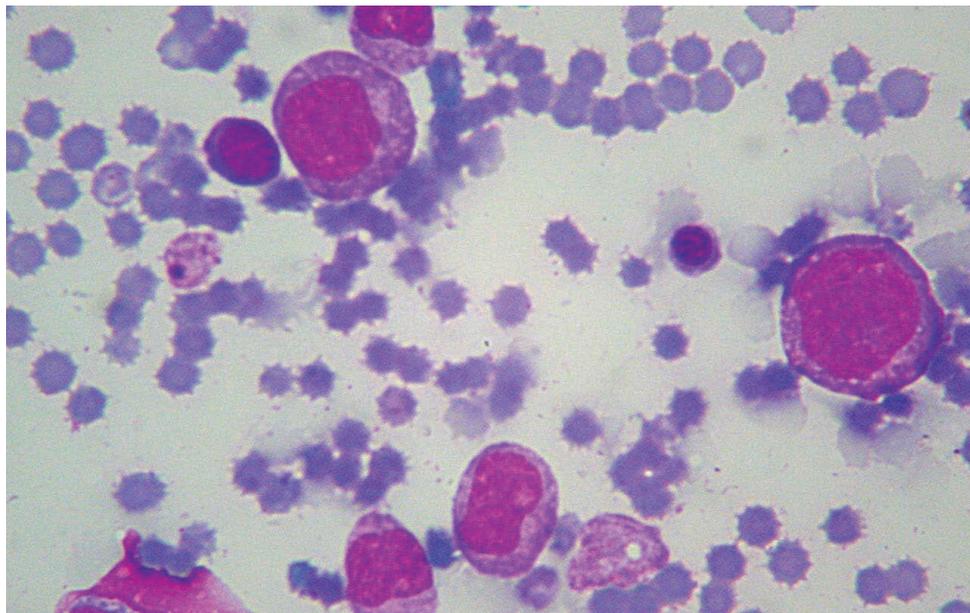
Cani ESPOSTI: cani privi di segni clinici/clinicopatologici riferibili a leishmaniosi, con basso titolo anticorpale ad esame sierologico

Cani INFESTATI: cani privi di segni clinici/clinicopatologici riferibili a leishmaniosi, ma con infestazione dimostrata mediante citologia/PCR  
Cani MALATI: cani infestati e con alterazioni clinicopatologiche riferibili a leishmaniosi

Cani GRAVEMENTE MALATI: cani infestati, con alterazioni cliniche/clinicopatologiche riferibili a leishmaniosi, compromissione della funzione renale, nefropatia proteino-disperdente e con altre patologie direttamente correlabili all'infestazione (es. poliartrite).

## LA DIAGNOSI DI INFEZIONE DA FIV E FELV: ISTRUZIONI PER L'USO!

di Nicola Decaro



Cari colleghi, l'epidemiologia, la patogenesi e la diagnosi di queste due comuni retrovirusi feline, sono molto più complesse di quanto si pensi comunemente.

Le infezioni da Feline Leukemia Virus (FeLV) e Feline Immuno-deficiency Virus (FIV) sono estremamente diffuse nella popolazione felina e rappresentano un serio rischio sanitario per i gatti.

Trattandosi di retrovirus, presentano caratteristiche eziologiche, epidemiologiche e patogenetiche peculiari che rendono la loro diagnosi più complessa di quanto potrebbe sembrare.

Grazie ai consigli dei nostri esperti, scopri come affrontare correttamente l'iter diagnostico.

Con il nostro consulente, *Prof. Nicola Decaro*, abbiamo quindi cercato di realizzare degli algoritmi diagnostici e una tabella esplicativa, che siamo certi vi saranno di aiuto nella diagnosi di queste infezioni.

## DEFINIZIONI

### FeLV

**Infezione “regressiva”:** Efficace risposta immunitaria. Presente “Viremia transitoria” (da 3 a 16 settimane) con eliminazione transitoria del virus nell’ambiente.

**Infezione “latente”:** Stadio di Infezione “regressiva” in cui il DNA provirale è nei leucociti circolanti e nel midollo osseo (dove si può avere una modesta replicazione), ma il gatto non è viremico né escretore. Possibili alterazioni ematologiche (anemia, trombocitopenia).

**Infezione “focale” o “atipica”:** Rare infezioni “naturali” non sistemiche, con localizzazioni, ad esempio, in ghiandola mammaria, utero ed apparato visivo.

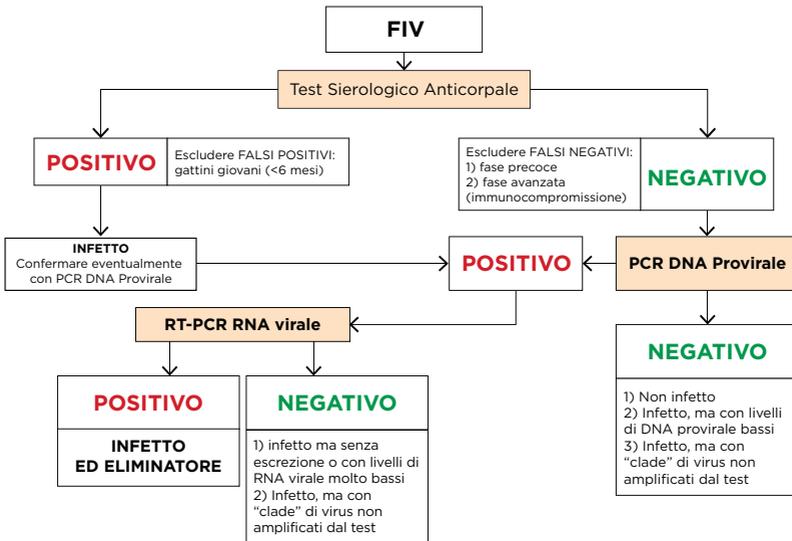
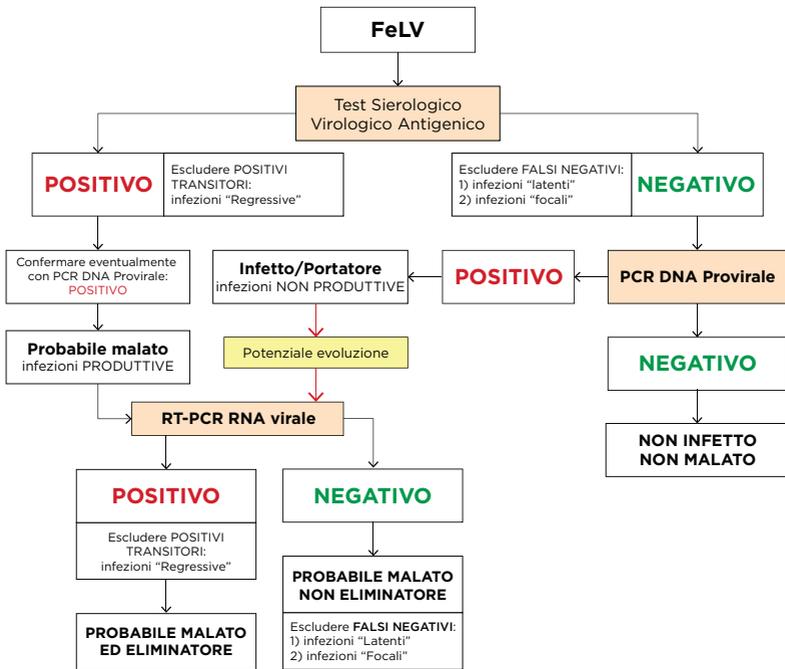
**Infezione “progressiva”:** Stadio di infezione “progressiva” con antigenemia persistente (p27 nel sangue) e replicazione virale con escrezione costante nell’ambiente. Condizione definita in passato “Viremia persistente”.

### FeLV – FIV

**Infezione “produttiva”:** Virus in replicazione.

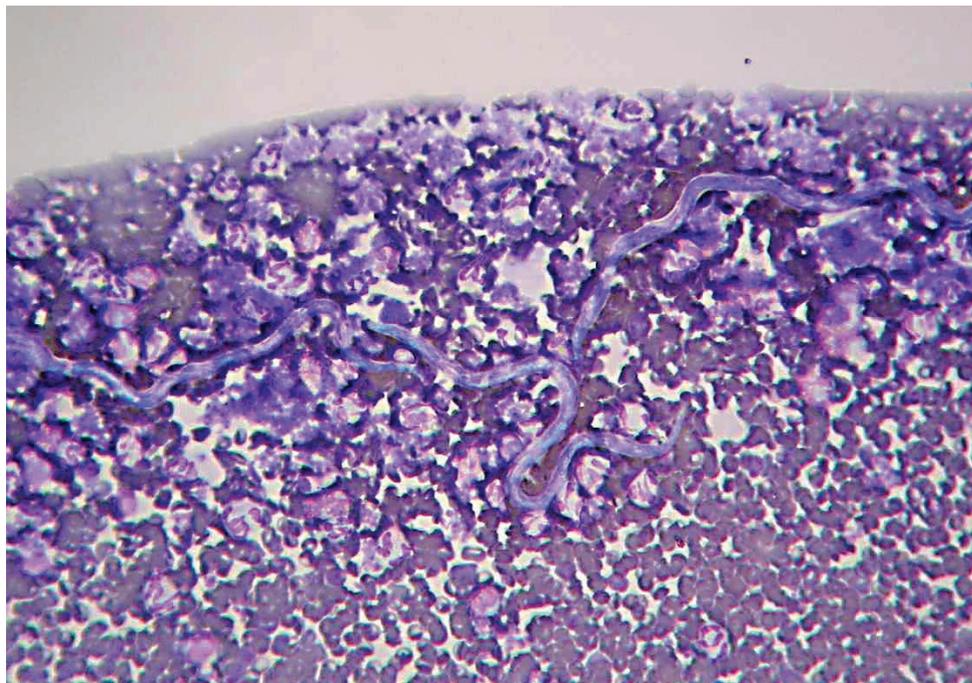
**Infezione “non produttiva”:** Virus non in replicazione. Portatore.

TEST	SIGNIFICATO	MATRICE	FALSI POSITIVI	FALSI NEGATIVI	NOTE
<b>FELV</b>					
SIEROLOGICO (VIROLOGICO) ANTIGENICO	Ricerca Antigene p27 • Positivo solo in caso di <b>INFEZIONE PRODUTTIVA (virus in replicazione)</b>	Sangue intero Siero Plasma	Infezioni "Regressive" (durante viremia transitoria)	Infezioni "Latenti" Infezioni "Focali"	<b>Identifica probabile malato</b>  Infezioni "Regressive": veremia transitoria (da 3 a 16 settimane) <b>Post infezione</b>
PCR - DNA PROVIRALE	Ricerca DNA provirale (integrato in DNA leucociti) • Positivo anche in caso di <b>INFEZIONE NON PRODUTTIVA</b>	Sangue intero (in EDTA) Midollo osseo	Infezioni "Regressive" (dopo viremia transitoria)	...	<b>Identifica portatore (non necessariamente malato)</b>  da usarsi in caso di infezioni "Latenti" ed infezioni "Focali" (pazienti negativi a test rapido VIROLOGICO)
RT-PCR - RNA VIRALE	Ricerca RNA virale • Positivo solo in caso di <b>infezione PRODUTTIVA (virus in replicazione ed escrezione)</b>	Saliva (tampone orale senza terreno di trasporto)	Infezioni "Regressive" (durante viremia transitoria)	Animali portatori ma non eliminatori (infezioni "Latenti" infezioni "Focali")	<b>PROBABILE MALATO-ELIMINATORE</b>
<b>FIV</b>					
SIEROLOGICO ANTICORPALE	Ricerca Anticorpi anti p24	Sangue intero Siero Plasma	Positività in gattini fino a 16 settimane - 6 mesi per anticorpi colostrali	<b>1) Stadio malattia precoce</b> <b>2) Stadio malattia avanzata (immunodepressione)</b> <b>3) Elevata replicazione virale</b>	Identifica possibile malato • in gattini positivi: ritestare 2 mesi dopo le 16 settimane • i gatti FIV positivi possono anche non presentare mai sintomi nel corso della loro vita
PCR - DNA PROVIRALE	Ricerca DNA provirale (integrato in DNA leucociti) • Positivo nei <b>portatori e malati</b>	Sangue intero (in EDTA) Midollo osseo	...	<b>1) infetto, ma con livelli di DNA provirale molto bassi</b> <b>2) Infetto, ma con "clade" di virus non amplificati dal test</b>	<b>Identifica possibile malato</b> Da usarsi in: • gattini POSITIVI al test sierologico per conferma • gatti NEGATIVI al test sierologico ma sospetti • gatti fortemente immunocompromessi
RT-PCR - RNA VIRALE	Ricerca RNA virale • Positivo solo in caso di <b>INFEZIONE PRODUTTIVA (virus in replicazione ed escrezione)</b>	Saliva (tampone orale senza terreno di trasporto)	...	<b>1) Infetto, ma senza escrezione o con livelli di RNA virale molto bassi</b> <b>2) Infetto, ma con "clade" di virus non amplificati dal test</b>	<b>POSSIBILE MALATO - ELIMINATORE</b>



## FILARIOSI CARDIOPOLMONARE CANINA – LE LINEE GUIDA INTERNAZIONALI

di Luigi Venco



Cari colleghi, la European Society of Dirofilariosis and Angiostrongylosis (ESDA) ha recentemente pubblicato le linee guida per la diagnosi e la gestione clinica delle diverse forme di filariosi canina e felina.

Per quanto è di nostro interesse, ovvero la diagnostica di laboratorio della malattia, si enfatizzano i seguenti punti:

- 1) I test antigenici sono dotati di ottima accuratezza diagnostica, tranne che nel caso di infestazioni con un modesto numero di parassiti, in particolare quando scarseggiano le femmine adulte.
- 2) andrebbe sempre fatta anche la ricerca di microfilarie mediante test di Knott, al fine di migliorare la sensibilità della ricerca e di trovare eventuali infestazioni miste con altre specie di filarie.

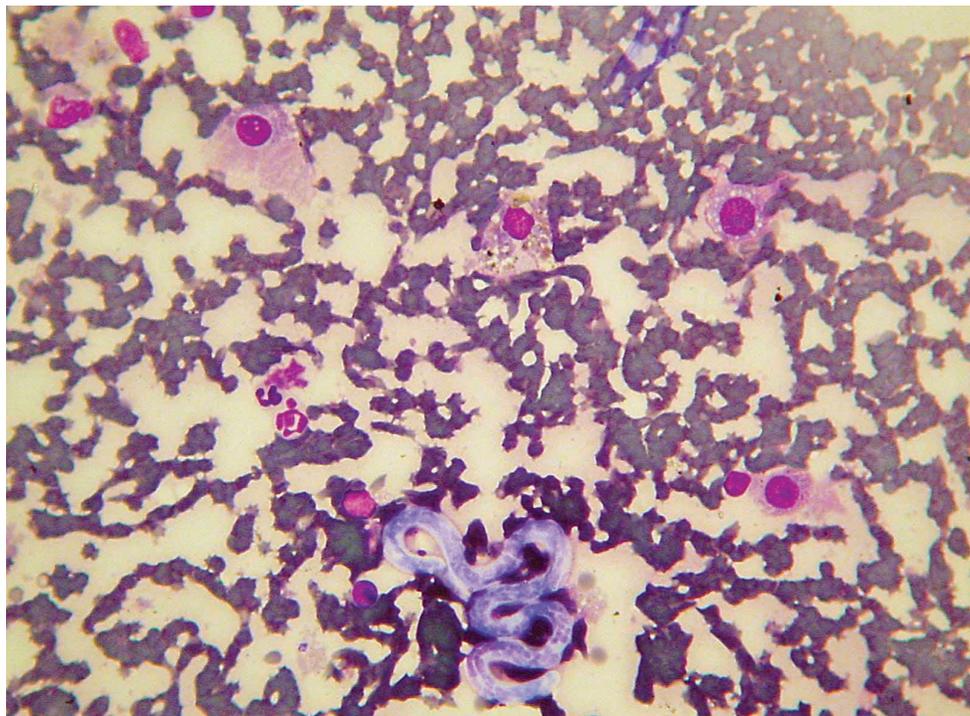
3) i test antigenici possono dare dei risultati falsamente positivi in caso di infestazione con *Angiostrongylus* o *Spirocerca*.

Da questo indirizzo potrete leggere il documento PDF che riassume tutti gli step essenziali per gestire correttamente la filariosi cardiopolmonare canina.

[CLICCA QUI PER LEGGERE IL PDF](#)

## FILARIOSI CARDIOPOLMONARE FELINA – LE LINEE GUIDA INTERNAZIONALI

di Walter Bertazzolo & Luigi Venco



Cari colleghi, questa settimana ci occuperemo delle linee guida relative alla diagnosi e gestione clinica della filariosi felina, secondo quanto recentemente pubblicato dalla ESDA (European Society of Dirofilariosis and Angiostrongylosis).

Per quel che è di nostro specifico interesse, ovvero la diagnostica di laboratorio, si sottolineano i seguenti aspetti da considerare attentamente:

- 1) I test antigenici canini possono essere utilizzati anche per il gatto, trattandosi di ricercare gli stessi antigeni parassitari. Tuttavia, dato che le cariche parassitarie nei gatti sono solitamente molto basse e spesso i parassiti non giungono a maturazione completa, è frequente ottenere risultati falsamente negativi. Inoltre si ritiene che i gatti presentino spesso complessi antigene-anticorpo che mascherino la rilevazione dei primi al test. Pertanto i test antigenici canini sono

da considerarsi altamente specifici in caso di risultato positivo, ma anche molto poco sensibili. Un pretrattamento del siero a 103° C per 10 minuti è secondo alcuni autori consigliabile per aumentare la sensibilità del test: con il riscaldamento si tenderebbero infatti a liberare gli antigeni dai complessi antigeni anticorpi.

- 2) I test anticorpali rilevano invece le immunoglobuline dirette specificatamente contro le filarie adulte o in via di sviluppo, e sono caratterizzate da sensibilità diagnostica buona ma specificità non ottimale, potendo dare dei risultati falsamente positivi (probabilmente per cross-reattività con altri parassiti).
- 3) Ricerca di microfilarie con test di Knott: la microfilaria nel gatto è un evento alquanto raro e solitamente è riconducibile a occasionali infestazioni cutanee/sottocutanee causate da *Dirofilaria (Noctiella) repens* (vedi figura sopra). Dato che difficilmente la *Dirofilaria immitis* raggiunge una maturazione sessuale nel gatto e che le infezioni sono pauci-parassitarie, è molto improbabile avere almeno due adulti di entrambi i sessi nello stesso paziente, tale da poter produrre microfilarie rilevabili nel circolo periferico. Se tuttavia queste vengono individuate mediante il test di Knott, allora la diagnosi di dirofilariosi cardiopolmonare è certa al 100%.

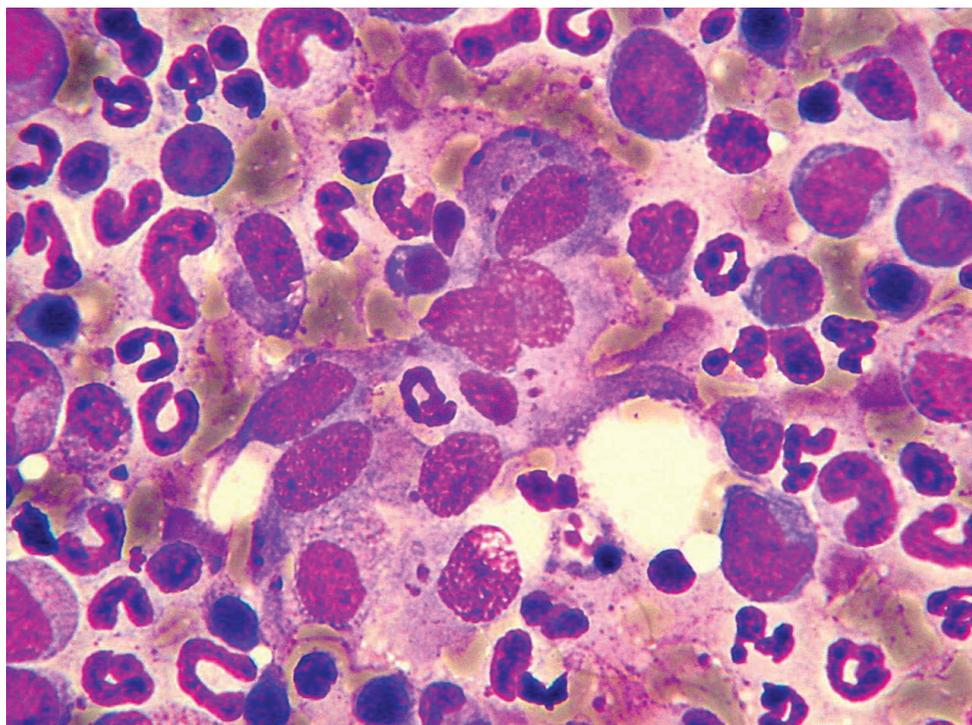
Dato che per i motivi sopra esposti, nessuno di questi esami ha una accuratezza diagnostica ottimale, per avere la massima possibilità di individuare l'infestazione è consigliabile eseguirli tutti contemporaneamente in un paziente con sospetto clinico.

Attraverso questo link potete scaricare il documento integrale, liberamente accessibile sul sito ufficiale, nel quale vengono forniti utili aggiornamenti riguardo questa parassitosi un po' trascurata e soprattutto difficile da diagnosticare.

[CLICCA QUI PER SCARICARE IL DOCUMENTO](#)

## PCR: DOVE TROVO L'AGENTE EZIOLOGICO?

di Walter Bertazzolo & Ugo Bonfanti



Cari colleghi, spesso ci chiedono quale substrato (matrice) sia consigliabile per cercare questo o quell'agente eziologico. Abbiamo cercato quindi di redarre un documento facilmente consultabile (tabella in PDF allegata) per riassumere i nostri consigli.

Va tuttavia tenuto ben presente che, sebbene la PCR sia un metodo alquanto sensibile e specifico nel rilevare agenti eziologici, anch'essa non può che fallire se in quel campione biologico non sono presenti in quel momento i microrganismi.

Pertanto, al fine di avere la massima probabilità di individuare un'infezione/infe-stazione, è molto importante non solo scegliere la matrice giusta, ma anche il momento giusto durante l'infezione: ogni agente eziologico e quindi ogni malattia infettiva ha una specifica patogenesi, che andrebbe studiata prima di decidere

per l'invio di un campione. Per esempio una patologia virale potrebbe avere una viremia molto transitoria e breve (es. CAV-1) oppure essere più prolungata (es. cimurro), per cui la possibilità di avere un risultato positivo dipenderà anche dal momento dell'infezione.

Le matrici riportate rappresentano indicazioni di massima. La presenza del patogeno all'interno del materiale da analizzare dipende infatti da numerosi fattori quali fase della malattia, condizioni immunitarie dell'ospite, eventuali terapie in atto. Si ricorda in ogni caso come sia pertanto necessario essere a conoscenza di patogenesi e modalità di contagio / trasmissione della malattia infettiva che si desidera indagare.

<b>Matrici PCR</b>		
<b>Esame</b>	<b>Prima scelta</b>	<b>Seconda scelta</b>
Adenovirus canino Tipo 1 epatite infettiva di Rubarth (CAV1)	Sangue K3EDTA	
Adenovirus canino Tipo 2 respiratorio (CAV2)	Tampone nasale/faringeo	
Aelurostrongylus abstrusus	Feci/BAL	
Anaplasma spp/phagocytophila/platys	Sangue K3EDTA	
Angiostrongylus vasorum	Sangue K3EDTA/BAL/Feci	
Astrovirus	Feci	
Babesia spp	Sangue K3EDTA	
Bartonella henselae	Sangue K3EDTA	Tampone orale
Bordetella bronchiseptica	Tampone nasale/faringeo/BAL	
Borrelia burgdorferi	Liquor (se neurologico)/liquido sinoviale/puntato linfonodale/midollo	Sangue K3EDTA
Brucella canis	Sangue K3EDTA/liquido seminale/puntato linfonodale	In caso di aborto: feto/invogli fetali (NO formalina)
Calicivirus felino	Tampone orale	
Chlamydia felis	Tampone congiuntivale	
Cimurro	Urine/liquor (se sintomi neurologici)/Sangue K3EDTA	
Coronavirus enterico canino	Feci	
Cryptosporidium	Feci	
Dirofilaria immitis - microfilarie	Sangue K3EDTA	
Dirofilaria repens - microfilarie	Sangue K3EDTA	
Ehrlichia canis/spp	Midollo/Puntato splenico	Sangue K3EDTA
FCoV/FIP	Versamento toracico/addominale	Feci (non discrimina FCoV da FIP/Sangue K3EDTA (probabile falso negativo)
FELV PROGENOMA	Sangue K3EDTA	
FELV REPLICATIVA - ELIMINATORE	Tampone orale	
FIV PROGENOMA	Sangue K3EDTA	
FIV REPLICATIVA - ELIMINATORE	Tampone orale	
Giardia	Feci	
Helicobacter spp	Feci/Biopsia gastrica	
Hepatozoon canis	Sangue K3EDTA/midollo	
Herpes virus canino	Tampone vaginale/prepuziale	In caso di aborto: feto/invogli fetali congelati (NO formalina)
Leishmania (tutti i tipi di PCR)	Midollo/puntato linfonodale	Sangue K3EDTA (poco sensibile)
Leptospira	Urine	Sangue K3EDTA (poco sensibile) (dipende dalla fase)
Mycoplasma haemofelis/turicensis/haemominutum	Sangue K3EDTA	
Mycoplasma spp/canis/haemominutum	Sangue K3EDTA	

## DOMANDE E RISPOSTE FREQUENTI SULL'ENCEFALITOOZONOSI DEL CONIGLIO

Intervista al dr. Gustavo Picci

Cari colleghi, inauguriamo un nuovo settore del nostro blog dedicato agli animali esotici. Abbiamo chiesto al nostro consulente *Gustavo Picci* di rispondere ad alcune frequenti domande su una patologia dei conigli, l'encefalitozoonosi.



### **Innanzitutto Gustavo, di cosa si tratta?**

L'encefalitozoonosi è una malattia parassitaria sostenuta dal protozoo *Encephalitozoon cuniculi*, parassita intracellulare obbligato e sporigeno.

### **Quali specie colpisce?**

L'ospite principale è il coniglio, ma raramente l'infestazione è stata osservata in roditori, gatti, pecore, cani, scimmie, maiali e capre. L'uomo può essere interessato solo se presenta grave immunodepressione, il contagio diretto dal coniglio non è documentato.

## **Qual è il ciclo biologico?**

L'urina è la via di eliminazione del parassita, i conigli infestati eliminano il protozoo sotto forma di spore che contaminano l'ambiente. Le spore infestano il nuovo ospite attraverso l'ingestione di acqua e di cibo contaminati. È descritta anche la trasmissione per via transplacentare e inalatoria. Il parassita entra nel circolo ematico e si diffonde a livello renale dove replica e viene eliminato all'esterno attraverso l'urina. Successivamente a questa fase replicativa dai reni si ha la diffusione al sistema nervoso centrale e al cristallino.

## **Dopo quanto tempo dal contagio si manifestano i sintomi?**

Non tutti i conigli manifestano sintomi. La maggior parte dei conigli infestati può restare asintomatica per tutta la vita, perché sviluppano un'infestazione cronica subclinica con formazione di lesioni granulomatose che incapsulano il parassita. Se il soggetto presenterà nel corso degli anni immunodepressione avremo la manifestazione clinica della malattia.

## **Quali sono i sintomi?**

La malattia si manifesta principalmente con sintomatologia neurologica: è possibile osservare atassia, sindrome vestibolare, tremori, convulsioni, nistagmo, paralisi, incontinenza urinaria. Pazienti affetti da incontinenza possono sviluppare dermatite perineale. La sintomatologia renale è in genere caratterizzata da insufficienza renale di grado lieve, accompagnata nelle forme avanzate da perdita di peso, poliuria/polidipsia e anoressia. Nella forma oculare si evidenzia cataratta, rottura del cristallino e uveite.

## **Quali sono le diagnosi differenziali?**

In diagnosi differenziale si devono considerare i traumi, le fratture spinali, le spondiliti, le infestazioni da *Toxoplasma*, le otiti medie e le otiti interne, gli ascessi e le infezioni cerebrali, le infezioni da *Listeria*, il colpo di calore, le intossicazioni da metalli pesanti e le neoplasie.

## **Come si procede ad una corretta diagnosi?**

La diagnosi di certezza ante-mortem non è possibile perché richiede l'esame istologico del tessuto cerebrale per evidenziare la presenza dei parassiti oppure per osservare le lesioni granulomatose.

È necessario quindi incrociare più test per la diagnosi in vivo correlandoli alla sintomatologia del paziente:

Emocromo e Esame Biochimico: sono in genere nella norma nelle forme acute.

Esame sierologico ricerca IgG: un titolo anticorpale positivo indica l'esposizione al parassita ma non attesta che questo sia la causa dei sintomi clinici. Il test è valido per escludere la malattia in caso di esito negativo limitando il campo ad altre diagnosi differenziali; sarà necessario, in questo caso, ripetere il test dopo quattro settimane in quanto un'infestazione recente avrà presumibilmente causato sierconversione.

Esame sierologico ricerca IgM: il titolo anticorpale aumenta a partire dal diciassettesimo giorno post infezione; possono risultare positivi anche alcuni conigli sani.

Elettroforesi: aumento costante e significativo della frazione gamma.

PCR: è possibile effettuare il test da urina sebbene l'eliminazione delle spore nelle urine avviene per un periodo limitato e in modo intermittente.

In che modo è possibile controllare la presenza del parassita?

È consigliabile isolare i coniglietti appena acquistati da altri conigli perché possono essere eliminatori fino a quattro mesi di età. La trasmissione postnatale si verifica entro le sei settimane dalla nascita e i piccoli elimineranno il parassita con le urine solo per un periodo limitato per cui da adulti non saranno infestanti.

## PAPPAGALLI E CHLAMYDIA PSITTACI

Intervista al dr. Gustavo Picci

Cari colleghi, questa settimana parliamo di animali esotici con il nostro consulente *Gustavo Picci*, in particolare approfondiremo il discorso relativo a pappagalli e *Chlamydia psittaci*.

*Chlamydia psittaci* è l'agente eziologico della chlamidiosi conosciuta anche come psittacosi o ornitosi.

Le *Chlamydiae* sono dei microrganismi gram negativi di forma sferica, dimensioni comprese tra 0,4 e 0,6 micron di diametro.

Sono definiti parassiti energetici perché utilizzano l'ATP prodotto della cellula. L'infezione può essere contratta dai pappagalli, da altre specie di uccelli (ad esempio canarini, piccioni, colombi), dai mammiferi e dall'uomo.

Grazie ai test di laboratorio abbiamo la possibilità di individuare uccelli portatori sani asintomatici ed eliminatori del batterio; infatti, i portatori inapparenti sono comuni e possono essere uccelli guariti dalla malattia o soggetti asintomatici.



### Come si può trasmettere?

La trasmissione orizzontale è quella più comune e si realizza attraverso l'inalazione di secrezioni respiratorie e/o di feci. La trasmissione verticale è stata descritta nel pappagallino ondulato. Sempre in questa specie è stato osservato che l'eliminazione con le feci può continuare per più di un anno dall'infezione.

### Principali segni clinici?

I giovani possono presentare la malattia in forma acuta con grave sintomatologia respiratoria, questo tipo di infezione esita nella maggior parte dei casi con la morte

degli animali. Le manifestazioni cliniche più frequenti sono: piumaggio arruffato, emaciazione, letargia, ipotermia, disidratazione e congiuntivite. Quando la patologia si cronicizza si evidenziano rantoli, scolo nasale, feci di colore giallo-verdastro per coinvolgimento epatico, perdita di peso e in alcuni pazienti si associano sintomi neurologici.

### **Quali sono le diagnosi differenziali da considerare?**

Le manifestazioni cliniche sono variabili ed essendo una malattia che si manifesta principalmente in forma cronica si può spesso associare ad altre patologie, per questo motivo è importante avvalersi di esami di laboratorio per raggiungere la diagnosi corretta. In diagnosi differenziale bisogna considerare infezioni da enterobatteri, herpesvirus, paramyxovirus, influenza A virus e mycoplasmosi.

### **A livello ematobiochimico che tipo di alterazioni si possono presentare?**

Nelle forme croniche avremo anemia con aumento di ALT, acidi biliari, acido urico, LDH e proteine totali. Si evidenzia, inoltre, marcata eterofilia con eterofili tossici e spostamento della curva a sinistra.

### **Quali sono le principali lesioni anatomico-patologiche?**

A seconda della forma clinica (iperacuta, acuta, subacuta e cronica) si possono trovare lesioni più o meno imponenti ed estese. Le principali lesioni sono: emorragie petecchiali, congestione, epato-splenomegalia, formazione di depositi superficiali di essudato fibrinoso, pericardite e periepatite fibrinosa, aerosacculite fibrinosa, congestione polmonare e polmonite.

### **Quali sono i test da effettuare per una corretta diagnosi?**

Il laboratorio MYLAV – La Vallonea ha la possibilità di proporre due test, un test per la ricerca anticorpale e i test di biologia molecolare.

Il test Elisa ricerca gli anticorpi IgG nel siero aviario. È necessario inviare al laboratorio circa 0.5 microlitri di siero. A volte un pappagallo positivo a questo test potrebbe non essere eliminatore.

Il test di biologia molecolare (Pcr-polymerase chain reaction) per la ricerca della Chlamydia è molto sensibile e specifico, ma non è consigliabile effettuarlo su pre-

lievi di sangue perché la Chlamydia non è presente nel sangue in modo costante. La PCR permette di individuare gli uccelli con infezione latente o persistente.

### **Cosa dobbiamo inviare al laboratorio per effettuare i test di biologia molecolare? Su quali campioni?**

Il test si può effettuare su *fecì* se vogliamo testare animali asintomatici ma eliminatori, in questo caso si deve utilizzare un tampone a secco senza terreno di trasporto prelevando più campioni di feci anche in giorni differenti. È possibile comunque effettuare il test anche su altro materiale biologico: sia in uccelli sintomatici che asintomatici possiamo utilizzare lo *scolo nasale e/o congiuntivale* e le *secrezioni del cavo orale*. Alcuni autori consigliano di effettuare un unico tampone a secco prelevando in ordine materiale biologico da congiuntiva, coane e cloaca. Questa tecnica può essere applicata anche nelle collezioni di pappagalli per monitorare lo stato sanitario dei riproduttori, dato che l'eliminazione della Chlamydia è intermittente si consiglia di ripetere il campionamento per tre giorni consecutivi.

Durante l'esame autoptico possiamo prelevare del materiale biologico da analizzare sempre con tecnica PCR.

### **Come si manifesta la malattia nell'uomo?**

L'uomo si infetta inalando i microrganismi che sono stati aerosolizzati da feci secche o da secrezioni delle vie respiratorie, dal contatto diretto della bocca con il becco e con piume contaminate. In passato quando non si disponeva di farmaci specifici, la mortalità era del 15-20 %, attualmente la mortalità è inferiore a 1%.

Nell'uomo causa polmonite interstiziale, mialgia, emicrania, ipertermia, endocardite, miocardite, epatite, artrite, cheratocongiuntivite, encefalite e aborto.



## LIPIDOSI GLOMERULARE RENALE NEGLI SCHAUZER NANI

di Walter Bertazzolo



Cari colleghi, vi sottoponiamo questa settimana questo interessante articolo pubblicato recentemente su *Veterinary Pathology*.

Gli autori hanno revisionato le alterazioni glomerulari renali in un gruppi di schnauzer nani, razza in cui si può osservare iperlipemia idiopatica e proteinuria. Lo studio apre nuovi scenari per lo studio e la gestione clinica di questi pazienti.

**Tratto da:** *Furrow et al. Glomerular lesions in proteinuric miniature schnauzer dogs. Vet Pathol 2017. 54: 484-489.*

**INTRODUZIONE:** l'ipertrigliceridemia è comune negli schnauzer nani ed è stata associata alla presenza di proteinuria. Si presume che l'iperlipidemia persistente possa indurre lesioni glomerulari croniche e determinare quindi una eccessiva perdita di proteine urinarie.

**OBIETTIVO:** valutare le lesioni glomerulari in cani di razza Miniature Schnauzer, sottoposti in passato a biopsia renale per patologia renale proteinurica, con un maggiore interesse per la prevalenza e le caratteristiche dei depositi lipidici glomerulari.

**MATERIALI E METODI:** si rivalutavano le biopsie renali di schnauzer nani con proteinuria (PU/CU  $\geq 0.5$ ); per essere inclusi i campioni bioptici dovevano essere non alterati (glomeruli intatti e non sclerotici). I campioni venivano sezionati e colorati con ematosilina-eosina, PAS, tricromica Masson, impregnazione argentea, rosso Congo e Oil Red O.

Veniva inoltre eseguita microscopia elettronica a trasmissione e immunofluorescenza per la ricerca di depositi di immuno-complessi.

**RISULTATI:** venivano inclusi 27 cani di razza Miniature Schnauzer (14 M e 13 F, età media 6.7 anni), 6 cani avevano glomerulonefrite da immunocomplessi. Uno era positivo all'immunofluorescenza ma non confermato alla microscopia elettronica. Due dei 7 cani con glomerulonefrite da immunocomplessi e 18 dei 20 senza, presentavano deposito di lipidi nei glomeruli.

Solo 7 cani nel complesso non presentavano depositi lipidici.

Le lesioni da deposito di lipidi divise in diverse categorie: tromboembolismi lipidici glomerulari, lipidosi glomerulare, deposito di lipidi all'interno della membrana basale glomerulare o del mesangio.

- Tromboembolismi: in 7 cani, fino a 50  $\mu\text{m}$  di diametro, presenti nel 4% fino al 91% dei glomeruli, confermati tramite colorazione con Oil Red O; di questi 7 cani, nessuno è risultato positivo all'immunofluorescenza, 5 avevano glomerulo-sclerosi focale segmentale, 1 sinechie glomerulari senza glomerulo-sclerosi e 1 arterio-nefrosclerosi.
- Lipidosi glomerulare: evidenziata in 1 cane (con ipertensione sistemica), fino a 100  $\mu\text{m}$  di diametro, coinvolto il 30% dei glomeruli; il 30% dei glomeruli aveva una morfologia immatura (piccoli, con pochi capillari e molti precursori dei podociti); non risultava positivo all'immunofluorescenza.
- Deposito lipidico nella membrana basale e nel mesangio: evidenziata in 6 dei 7 cani con tromboemboli, nel cane con lipidosi glomerulare e in altri 12 cani; la diagnosi istologica in questi casi andava da una glomerulo-sclerosi focale segmentale ad una glomerulosclerosi diffusa segmentaria e globale; 4 avevano anche un'atrofia glomerulocistica.

Non risultavano differenze significative tra le varie categorie per quanto riguarda segnalamento (età e sesso), rapporto proteine/creatinina urinaria, albumine e creatinina sierica e pressione sistolica.

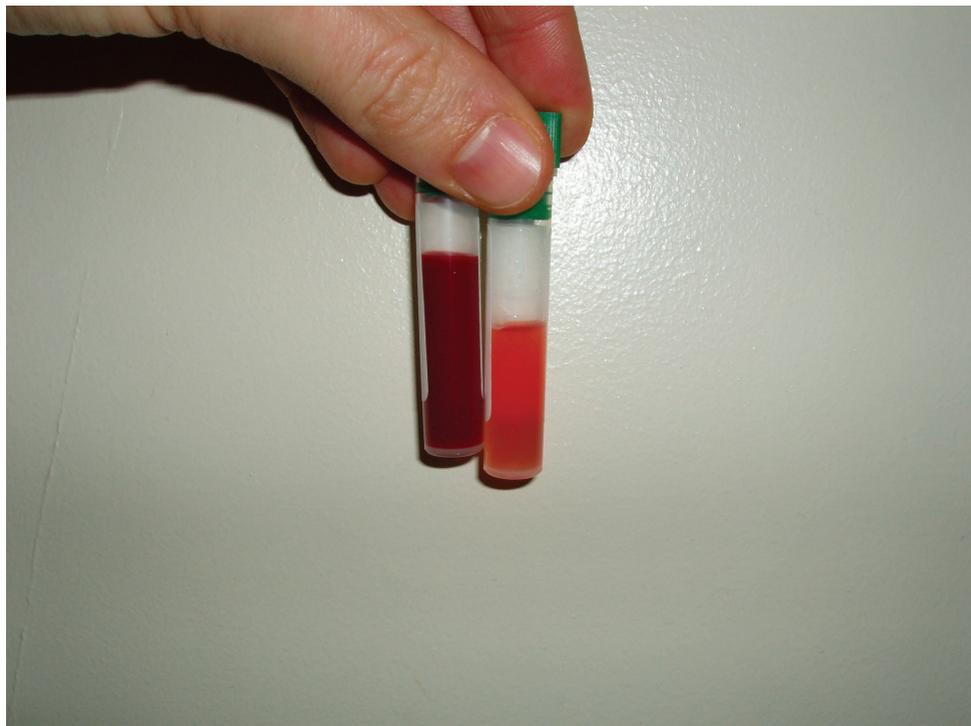
Erano disponibili i valori dei trigliceridi sierici per 6 cani su 7 con tromboembolismi: tutti risultavano ipertrigliceridemicici. Uno dei cani con tromboembolismi aveva anche iperadrenocorticismo (sotto controllo con trilostano). Uno dei cani con depositi lipidici nella membrana basale e nel mesangio aveva anche iperadrenocorticismo non trattato. Nessuno aveva diabete mellito o ipotiroidismo. Per la maggior parte dei cani purtroppo non erano disponibili i valori di trigliceridemia e colesterolo.

**CONCLUSIONI:** L'ipertrigliceridemia idiopatica è frequente negli schnauzer nani (probabilmente ha un'origine genetica, poco conosciuta) tuttavia è spesso associata a proteinuria.

I depositi lipidici renali sono presenti nella maggior parte delle biopsie renali di questi schnauzer proteinurici presi in considerazione. In particolare la presenza di emboli lipidici glomerulari è molto specifica di questa razza. La lipidosi glomerulare invece si osserva anche in altri cani. Solo 6 dei 27 cani (22%) aveva una glomerulonefrite da immunocomplessi: valore più basso rispetto alla media riportata in passato dallo stesso gruppo (o per minore incidenza in questa razza o per un rischio maggiore per altre glomerulopatie). Ulteriori studi sono necessari per valutare l'andamento clinico di queste alterazioni, la loro associazione con l'iperlipemia e le eventuali terapie possibili, anche quelle dietetiche.

## IL DOSAGGIO DELL'LDH NEI VERSAMENTI CAVITARI

di Walter Bertazzolo



Perché negli esami citochimici dei versamenti cavitari è utile anche la misurazione dell'attività dell'enzima LDH (lattato-deidrogenasi) ? Scopriamo insieme le informazioni utili che questo analita ci può dare.

Un recente articolo (*Smuts et al Vet Clin Pathol 2016; 45(4): 680-688*) ha mostrato quali possono essere i vantaggi nella misurazione dell'LDH nei liquidi cavitari: essendo rilasciato dalle cellule (eritrociti, cellule infiammatorie, cellule neoplastiche, ecc.) la sua concentrazione tende ad essere elevata nei campioni che hanno una eziopatogenesi infiammatoria (essudati), neoplastica o emorragica.

Viceversa nei campioni di natura trasudatizia la concentrazione dell'LDH risulta molto più bassa. Pertanto l'attività dell'enzima può risultare particolarmente utile nella corretta classificazione di quei versamenti in cui è difficile distinguere tra una

patogenesi infiammatoria (essudati) e trasudatizia (quindi legata a fenomeni da stasi o da discrasie proteiche), utilizzando i criteri classici (concentrazione proteica, conta cellulare, citologia).

Basandoci sui dati pubblicati e su nostre valutazioni interne, attualmente consigliamo le seguenti linee guida interpretative (utilizzabili con il nostro metodo biochimico interno):

**Trasudato povero in proteine (trasudato puro):** ha solitamente valori di LDH molto bassi, solitamente di poche decine di UI/l, raramente di 200-300UI/l.

**Trasudato ricco in proteine (trasudato modificato):** ha solitamente valori di LDH di alcune centinaia, quasi mai al di sopra dei 1000 UI/l.

**Essudati e versamenti neoplastici:** hanno solitamente valori di LDH molto superiori a 1000 UI/l, spesso anche di parecchie migliaia.

Versamenti emorragici: possono avere valori variabili, da diverse centinaia di UI/l a diverse migliaia, probabilmente in relazione alla quantità di RBC e cellule nucleate presenti nel campione.

## OBESITÀ ED ESAMI DI LABORATORIO NEL CANE

di Walter Bertazzolo

Cari colleghi, un recente studio ha valutato l'effetto del sovrappeso sui risultati di laboratorio (ematologia e biochimica) nel cane.

L'obesità è considerata una vera condizione patologica che in alcuni animali e nell'uomo si associa ad una condizione pro-infiammatoria cronica. Gli adipociti in eccesso infatti tendono a rilasciare una maggior quantità di proteine pro-infiammatorie che si pensa possano contribuire alle numerose condizioni patologiche associate all'obesità nell'uomo e negli animali (endocrinopatie, malattie muscolo-scheletriche, metaboliche, cardiocircolatorie, ecc.).

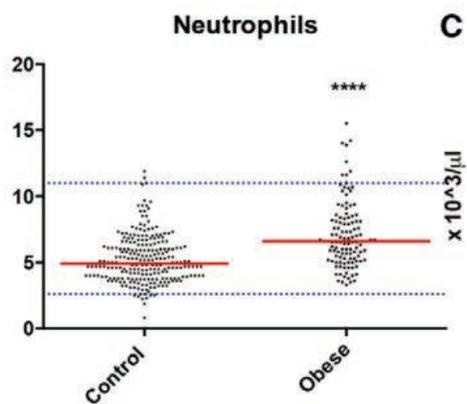
Visto che l'obesità inizia ad essere un problema anche negli animali d'affezione, un recente studio ha valutato l'effetto di un eccessivo stato di nutrizione sui risultati degli esami di laboratorio.

Sono stati confrontati i risultati di esami di controllo preoperatori in due gruppi di cani sani; il primo costituito da soggetti in condizioni di nutrizione normali (240 cani), il secondo invece da pazienti in sovrappeso (116 cani).

I cani obesi mostravano alterazioni rispetto ai cani sani nei seguenti rilievi:

- 1) **Leucociti:** risultavano leggermente più alti, con neutrofilia e modica monocitosi.
- 2) **Proteine:** erano più alte nei pazienti in sovrappeso rispetto ai normali, con un aumento sia di albumine che di globuline.
- 3) **Elettroliti:** alcuni elettroliti (calcio, sodio, potassio) risultavano leggermente aumentati nei pazienti obesi, mentre il cloro risultava diminuito.

Gli autori ritengono che queste lievi alterazioni, clinicamente poco rilevanti vista l'entità delle differenze tra i pazienti normali e quelli sovrappeso, siano tuttavia riconducibili ad una riduzione della quota di acqua libera nel plasma dei pazienti obesi oltre che ad un possibile stato infiammatorio cronico sub-clinico e/o di stress cronico.



(Radakovich et al, *Veterinary Clinical Pathology*; 2017, 46:221-226).

## MA I LEVRIERI SONO VERAMENTE DEI CANI?

di Walter Bertazzolo



Cari colleghi, quando valutiamo numerose variabili biologiche dei levrieri, viene da chiedersi se i cani di queste razze siano effettivamente cani o appartengano ad una altra specie. Sarà infatti capitato a molti di noi di effettuare delle indagini diagnostiche in un levriero sano e rilevare numerosi risultati “anormali” per un cane. Molte di queste alterazioni rappresentano in realtà degli adattamenti indotti dalla selezione umana al fine di migliorare le loro prestazioni sportive.

È importante sapere che i levrieri presentano numerose caratteristiche tipiche, per evitare di incorrere in errori diagnostici. In questo blog vi proponiamo una tabella riassuntiva di quelle variabili misurabili in laboratorio che possono sembrare “anomale” ma sono assolutamente normali in queste razze sportive (vedi tabella allegata).

Per la stesura della tabella ci siamo avvalsi di una review apparsa nel 2011 sul *Veterinary Clinical Pathology* (Zald et al 2011; *Vet Clin Pathol* 40(4): 414-425).

**TABELLA RIASSUNTIVA DI ALCUNE VARIABILI DI LABORATORIO TIPICHE DEI LEVRIERI**

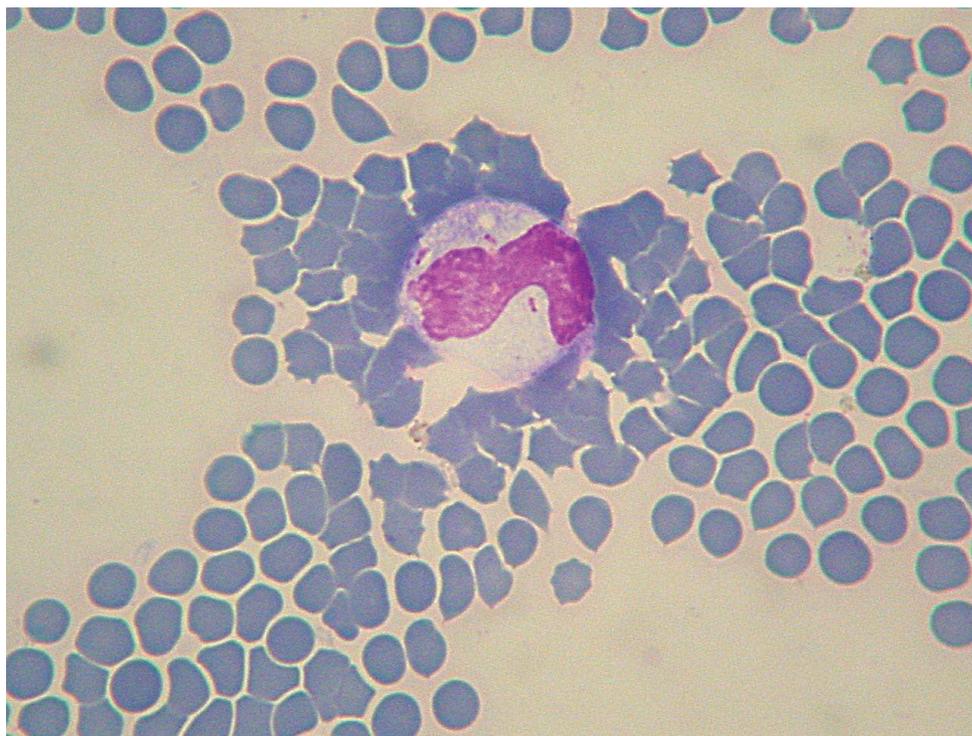
Variabile (Analita)	Alterazione tipica di razza	Note e intervalli di riferimento di razza
<b>ERITROCITI</b>		
Ematocrito	Aumento	50-68% *
RBC	Aumento	6,7-9,2x10 <sup>6</sup> /uL *
Emoglobina	Aumento	16,9-22,8 g/dL *
MCV	Aumento	70-80 fL *
<b>PIASTRINE ed EMOSTASI</b>		
PLT	Lievemente diminuite	145-309 *
Fibrinogeno	Lieve riduzione	80-190 mg/dL
Emostasi generale	Eccessivo sanguinamento post-chirurgia	Probabile accelerata fibrinolisi
<b>LEUCOCITI</b>		
WBC	Diminuiti	3400-8500/uL *
Neutrofili	Diminuiti	2200-6500/uL *
Linfociti	Diminuiti	600-2500/uL *
Eosinofili	Granuli poco colorabili	Colorazione grigia del citoplasma
Gruppo sanguigno	Elevata prevalenza DEA1.1 negativi	
Vita media RBC	Ridotta	Circa 50-60 giorni (circa 100 nel cane)
<b>CHIMICA CLINICA</b>		
Creatinina	Aumento (effetto della aumentata massa muscolare)	1,1-2,0 mg/dL
Proteine plasmatiche	Lieve riduzione di alfa e beta globuline	
Proteine di fase acuta	Aptoglobina ridotta	
AST/GOT e ALT/GPT	Lieve aumento	
Sodio e Cloro	Lieve aumento	Na 149-157 mmol/L Cl 110-122 mmol/L
Potassio, Calcio libero, Magnesio	Lieve diminuzione	
Bicarbonati e tCO <sub>2</sub>	Lieve aumento	
Ormoni tiroidei	Riduzione di tT4 e fT4	cTSH normale
Troponina	Lievemente aumentata	Consequente ad aumento della massa muscolare cardiaca

Tratto da Zald et al (2011) *Vet Clin Pathol* 40(4): 414-425)

\*(Riferimenti misurati tramite contaglobuli serie ADVIA)

## COME E QUANDO ESEGUIRE UN'EMOCOLTURA

Redatto dallo staff del Laboratorio MyLav



L'emocoltura è indicata per tutti i pazienti che presentano SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome), infezioni sistemiche, o sepsi, ovvero con segni clinici quali febbre, tachicardia e tachipnea, dispnea, shock, anuria e oliguria, ittero, e segni di laboratorio quali leucocitosi/leucopenia, neutropenia, ipoglicemia, iperbilirubinemia e trombocitopenia. Ha lo scopo di ricercare la presenza di batteri circolanti, quali indice di setticemia. Questa evenienza è particolarmente grave e si può associare più frequentemente a infezioni sistemiche quali piometra, endocardite batterica, infezioni polmonari, pielonefrite, ecc.

Fattore critico per un risultato favorevole è la tecnica del prelievo e la quantità di sangue prelevato, in quanto la concentrazione di batteri nel sangue risulta essere solitamente molto bassa.

Si consiglia idealmente di prelevare il sangue prima della somministrazione di una terapia antibatterica sistemica, oppure, se iniziata la terapia, dopo la sospensione dell'antibiotico-terapia per almeno 3-5 giorni. È possibile anche eseguire il prelievo in corso di terapia antibatterica nel caso in cui i segni clinici o di laboratorio permangano nonostante il trattamento in corso. È inoltre consigliabile eseguire contemporaneamente anche una urinocoltura.

Per una corretta esecuzione del test è fondamentale rispettare rigorosamente la procedura di campionamento, per non contaminare la coltura alterando l'esito dell'esame (falso positivo). I batteri isolati dal sangue, infatti, possono essere responsabili di batteriemia o essere dei semplici contaminanti raccolti accidentalmente durante il prelievo. È molto importante prelevare la giusta quantità di sangue per poter identificare l'eventuale microrganismo presente e non incorrere nel rischio di un falso negativo.

### **Procedura:**

- 1) scegliere un vaso di calibro adeguato al prelievo attraverso la visualizzazione e la palpazione
- 2) disinfettare la cute con antisettico (tipo scrub pre-operatorio, per es. con Clorexidina alcoolica)
- 3) eseguire la venipuntura facendo attenzione a non toccare con le dita la cute nel sito di prelievo (se necessaria una ulteriore palpazione indossare guanti sterili) e prelevare:
  - almeno 10 ml di sangue nei cani di grossa taglia per flacone
  - da 5 a 10 ml di sangue nei cani di media taglia per flacone
  - non meno 5 ml di sangue nei cani di piccola taglia o nel gatto per flacone
- 4) rimuovere il tappo a strappo di plastica, evitando di toccarlo in quanto sterile
- 5) Introdurre il sangue prelevato in entrambi i flaconi (anaerobi ed aerobi) evitando di inserire aria e capovolgere delicatamente il flacone per diverse volte.

I flaconi non devono essere mai refrigerati o congelati e devono essere conservati a temperatura ambiente in posizione verticale in modo che il fondo non sia esposto a fonti luminose.

## Interpretazione dei risultati

Può essere difficile determinare se il batterio isolato è patogeno o semplicemente un contaminante: conoscere i batteri della normale flora cutanea del cane e del gatto aiuta il veterinario nell'interpretazione dei risultati.

Stafilococchi coagulasi negativi, Streptococchi  $\beta$ -emolitici, Micrococcus ed Acinetobacter sono normali commensali della cute del cane, Staphylococcus intermedius del pelo.

Micrococcus, Acinetobacter e Streptococchi  $\beta$ -emolitici sono da considerarsi normale flora della cute del gatto.

L'isolamento di uno di questi microrganismi è quindi da considerarsi sospetto per una possibile contaminazione al prelievo.

## ERITROCITOSI: CHE FARE?

di Walter Bertazzolo



*Figura 1 – Gatto policitemico con evidente iperemia del tartufo.*

Siete di fronte ad un caso di aumento evidente dell'ematocrito (eritrocitosi) e non sapete che fare?

Vi proponiamo un algoritmo diagnostico per la ricerca delle cause di eritrocitosi nel cane e nel gatto.

Questa condizione, anche definita inappropriatamente policitemia, può riconoscere diverse cause: con un procedimento diagnostico ragionato per step successivi è solitamente agevole arrivare ad una diagnosi eziologica.

**1° step:** escludere cause fisiologiche (es. Levrieri o cani che vivono in altura).

**2° step:** escludere una eritrocitosi relativa: questa è la causa più comune in ambito clinico, ed è dovuta ad una emoconcentrazione per perdita di liquidi (es. come conseguenza di vomito, diarrea, PU/PD, ecc.). La valutazione clinica (presenza di mucose asciutte, cute anaelastica, TRC allungato), la possibile iper-proteinemia ed aumento di altri analiti (es. Sodio, cloro, azotemia) e la rapida correzione con la fluidoterapia permettono di diagnosticare facilmente questa situazione.

**3° step:** escluse le prime due cause, allora siamo di fronte ad una eritrocitosi assoluta. Questa può dipendere da poche cause cliniche:

**A) Endocrinopatie** come Cushing nel cane ed ipertiroidismo nel gatto: si tratta tuttavia di eritrocitosi di entità modeste e la diagnosi è basata sui riscontri clinici e gli appropriati test endocrini.

Le cause successive possono invece essere responsabili di eritrocitosi molto marcate, con valori di ematocrito anche superiori a 70-80%.

**B) Eritrocitosi secondaria assoluta appropriata:** dipende da una ridotta PaO<sub>2</sub> cronica con conseguente iperproduzione adeguata di eritropoietina (EPO). È causata da gravi problemi cardiopolmonari (es. cardiopatie congenite nei pazienti giovani, fibrosi polmonare, ecc.). L'esecuzione di un emogas arterioso e di una diagnostica per immagini approfondita del torace sono essenziali per la diagnosi.

**C) Eritrocitosi secondaria assoluta inappropriata:** non dipende da una ridotta PaO<sub>2</sub> ma da condizioni che conducono ad una inappropriata produzione di EPO quali neoplasie renali, masse para-renali neoplastiche e non, oltre che rari tumori che sono in grado di produrre EPO in maniera ectopica. Anche in questo caso l'esecuzione di un emogas arterioso e di una diagnostica per immagini approfondita dell'addome è essenziale.

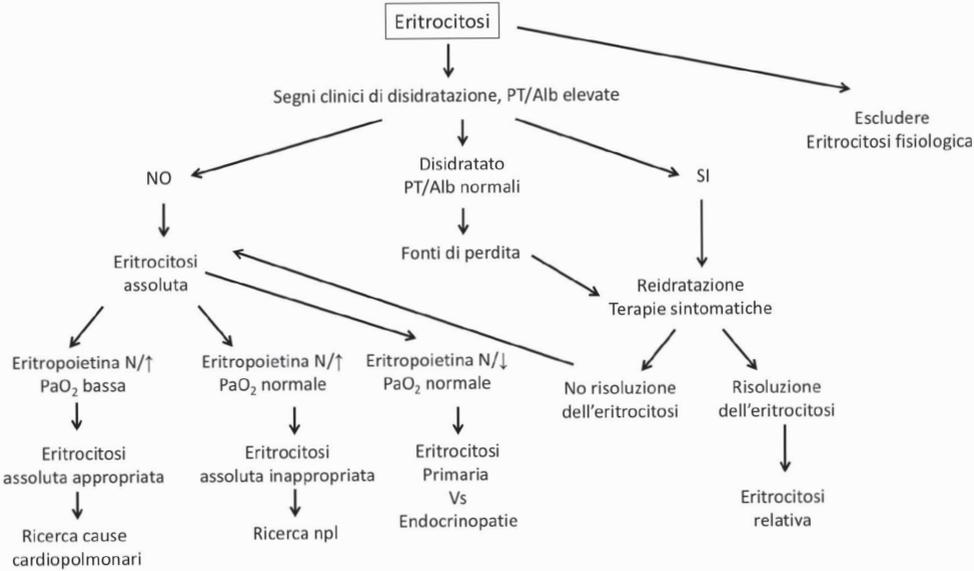
**D) Policitemia vera (eritrocitosi primaria):** è una neoplasia ematopoietica cronica che colpisce la linea degli eritrociti e conduce a una continua ed eccessiva produzione di globuli rossi. Questa diagnosi è raggiungibile solo dopo esclusione di tutte le precedenti cause.

Infine è necessario sfatare alcuni miti sul procedimento diagnostico: innanzitutto l'utilità della misurazione dell'EPO che ha valore questionabile per problemi analitici ma anche per la notevole sovrapposizione dei valori di EPO tra le varie forme

di eritrocitosi. Molti richiedono l'esame del midollo osseo in questi casi, convinti che possa permettere una diagnosi definitiva: purtroppo i riscontri citologici sono sovrapponibili tra le varie forme e la procedura è quindi di scarsa utilità.

Vi alleghiamo un algoritmo schematico di quanto esposto sopra.

## Algoritmo clinico-patologico dell'eritrocitosi



## TROMBOCITOSI: CHE FARE?

di Walter Bertazzolo, Pino Menga & Ugo Bonfanti

Tratto da: Woolcock et al JVIM 2017; 31: 1691-1699

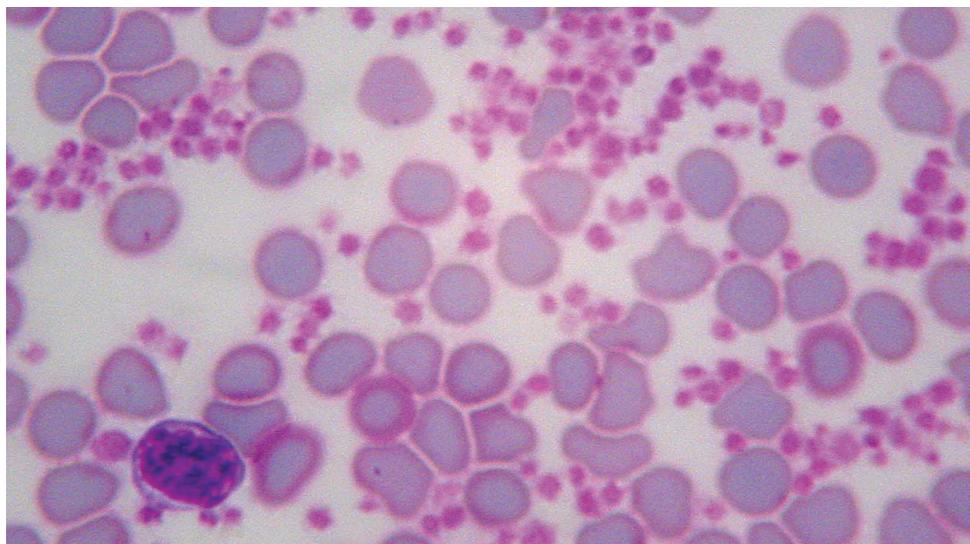


Figura 1 – Sangue periferico; trombocitosi.

La trombocitosi è definita come un aumento del numero di piastrine nel sangue periferico (vedi Figura 1) e si distingue in:

- 1) **Primaria:** disordine proliferativo che interessa la linea megacariocitica/piastrinica dalle cause sconosciute ed è definita come “trombocitemia essenziale”. Per la diagnosi di questa rara condizione è necessario escludere tutte le altre cause di trombocitosi secondaria sotto elencate.
- 2) **Secondaria:** molto più comune della primaria, può dipendere da numerose condizioni patologiche:
  - a) Inflammatorie: è causata da una iperproduzione di citokine infiammatorie, tra cui l’interleukina-6, che promuove la sintesi epatica di trombopoietina (TPO), ormone che stimola la produzione di piastrine nel midollo osseo.

b) Traumatiche: causata probabilmente da meccanismi differenti tra cui infiammazione e stimolazione della trombopoiesi a seguito della perdita ematica.

c) Neoplastiche: anche in questo caso i meccanismi eziopatogenetici sono multipli ed includono induzione di infiammazione, emorragie e possibile produzione di sostanze trombopoietiche direttamente da parte del tumore.

d) Endocrine (es. Iperadrenocorticismo spontaneo): il cortisolo tende ad aumentare la concentrazione piastrinica secondo meccanismi non ben definiti. Anche l'ipersecrezione di catecolamine aumenta momentaneamente la concentrazione piastrinica, soprattutto per contrazione splenica (che rappresenta una riserva di piastrine).

e) Splenectomia: la milza è un serbatoio naturale di piastrine e la sua rimozione conduce ad aumenti persistenti e moderati della concentrazione piastrinica.

f) Trombocitosi "rebound": è secondaria a gravi condizioni di piastrinopenia, nelle quali la causa della riduzione piastrinica viene successivamente rimossa o controllata. Il midollo osseo, divenuto nel frattempo iperplastico, produce quindi un aumentato numero di piastrine.

g) Carenza di ferro: le anemie emorragiche croniche conducono a carenza di ferro e a trombocitosi, probabilmente perché il ferro è un inibitore naturale della TPO e in sua carenza l'effetto di quest'ultima è incrementato.

h) Somministrazione di alcuni farmaci tra cui cortisonici, epinefrina e vincristina.

La trombocitosi può essere un problema clinico, soprattutto se persistente ed "estrema" (ovvero con conte piastriniche  $> 1.000.000/uL$ ), essendo associata a rischi tromboembolici documentati nell'uomo.

Uno studio realizzato presso la Purdue University ha valutato quali fossero le condizioni patologiche più comunemente associate a trombocitosi nel cane. Sono stati inclusi nello studio quei casi che presentavano conte piastriniche  $> 500.000/uL$  nel quinquennio 2011-2015. La prevalenza di trombocitosi era del 5.4% considerando il numero di emocromi analizzati, e del 7.2% considerando il numero di cani affetti (alcuni cani erano stati sottoposti a più emocromi nel quinquennio).

Le principali cause di trombocitosi erano le neoplasie (circa la metà dei casi), seguite a breve distanza dalle patologie infiammatorie. Numerosi tipi tumorali erano associati a trombocitosi tra cui in ordine di frequenza i carcinomi transizionali, il



linfoma, i sarcomi ed il mastocitoma. Le endocrinopatie (Cushing, diabete mellito e ipotiroidismo) rappresentavano circa 1/10 dei casi riscontrati.

Un numero elevato di soggetti (circa 16%) presentava tuttavia patologie multiple e in molti casi vi era un concomitante trattamento con cortisonici (circa 1/3 dei casi totali individuati nello studio).

Non vi erano differenze significative nell'entità della trombocitosi in queste diverse categorie (vedi Figura 2 tratta dall'articolo originale, disponibile liberamente online).

Non si riscontrava nessun caso di trombocitemia essenziale, confermando la rarità della condizione.

In conclusione, da questo studio emergeva come:

- La trombocitosi è quasi sempre associata a neoplasie, malattie infiammatorie e/o trattamenti con cortisonici.
- Le principali patologie infiammatorie riscontrate erano le malattie immuno-mediate, le infiammazione gastro-enteriche e quelle epatobiliari.
- La somministrazione di cortisonici in molte di queste patologie potrebbe essere la vera causa di trombocitosi, talora estrema.
- La pseudo-iperkaliemia è un riscontro comune nei cani con trombocitosi ed è legata ad un rilascio eccessivo di potassio da parte delle piastrine in-vitro.

Rischio tromboembolico: a differenza dell'uomo, non ci sono dati certi relativi al rischio tromboembolico nei cani con trombocitosi e di conseguenza mancano linee guida terapeutiche a riguardo.

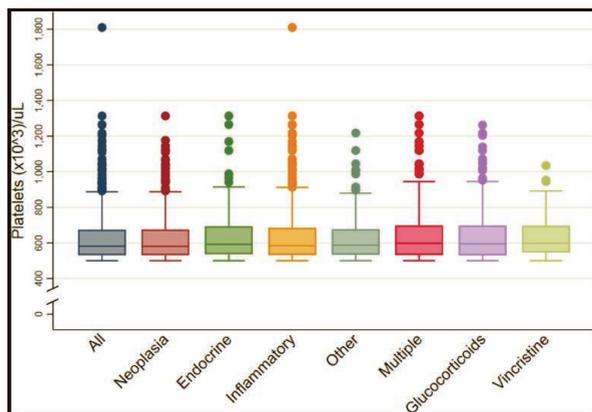


Figura 2 – Comparazione dell'entità della trombocitosi.

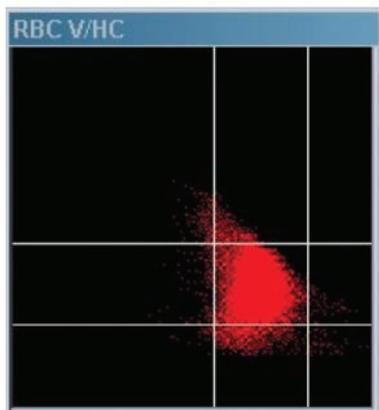
## SCOPRIAMO I SEGRETI DELL'EMOCROMO MYLAV PARTE I°

di Walter Bertazzolo

Cari colleghi, alcuni di voi ci hanno chiesto chiarimenti relativamente ai numerosi dati che vengono forniti dai nostri emogrammi.

Ho quindi deciso di inaugurare una nuova sezione del blog, EMATOLOGIA per l'appunto, in cui cercherò di volta in volta di chiarire il significato di questi numeri dal significato apparentemente "occulto".

Va innanzitutto ricordato che la contaglobuli utilizzata presso il nostro laboratorio è un ADVIA 2120, strumento che è in grado di analizzare i campioni di sangue con tecnologie molto avanzate e non disponibili con le comuni contaglobuli che siamo abituati ad utilizzare in clinica.



Oggi inizierò spiegandovi perché nei nostri emocromi compare sia il valore di emoglobina (indicata come "HGB") che di emoglobina intra-eritrocitaria (indicata come "cellular HGB").

Il valore di HGB è misurato come in ogni altra contaglobuli, lisando tutti gli eritrociti e misurando quindi l'emoglobina liberatasi mediante un banale metodo spettrofotometrico.

Il valore di Cellular HGB invece è determinato da ADVIA misurando direttamente il contenuto di emoglobina all'interno di ogni singolo eritrocita.

La differenza tra i due metodi di misurazione dell'emoglobina è anche definito HGB-delta.

In condizioni ideali, i valori di HGB e di Cellular HGB ovviamente devono coincidere, anche se ci possono essere lievi differenze tra i due (solitamente non superiori ai 0,5-1 g/dL).

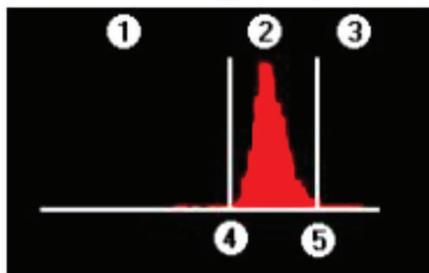
Nel caso in cui la discrepanza tra i due valori sia marcata, bisogna considerare che ci possa essere una emolisi (in vivo o in vitro) o che sia presente qualche sostanza interferente (per esempio infusione di emoglobina sintetica o lipemia), situazioni nelle quali l'HGB risulta falsamente aumentata rispetto al reale contenuto intra-eritrocitario.

Nella prossima puntata spiegheremo come ADVIA determina gli indici eritrocitari e come sfruttarli al massimo.

## SCOPRIAMO I SEGRETI DELL'EMOCROMO MYLAV PARTE 2°

di Walter Bertazzolo

### RBC HC histogram (normal sample)



- 1 Hypochromic region
- 2 Normochromic region
- 3 Hyperchromic region
- 4 28 g/dL marker
- 5 41 g/dL marker

In questo secondo post relativo all'analisi dell'emogramma MyLav, ci occuperemo degli indici eritrocitari.

Avrete notato che nei nostri emocromi, oltre ai classici MCV, MCH ed MCHC, vi sono altri due indici dal significato apparentemente "oscuro": il **CH** ed il **CHCM**. Cosa sono?

Il sistema ADVIA determina due gruppi di indici eritrocitari, in base a come l'emoglobina è stata misurata (vedi a tal proposito il post precedente relativo a questo argomento).

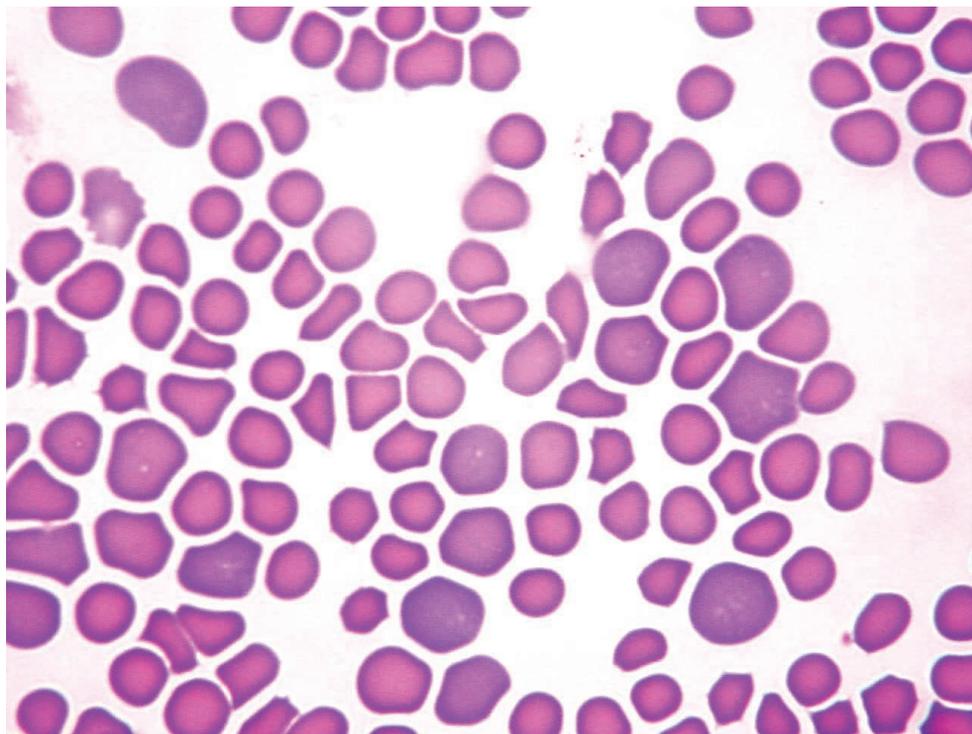
- 1) Indici eritrocitari classici: sono determinati come in altre comuni contaglobuli ad impedenza o laser, mediante la misurazione diretta del volume eritrocitario medio (MCV) e dell'emoglobina totale. Si possono così calcolare anche l'MCH (contenuto emoglobinico corpuscolare medio) e l'MCHC (concentrazione emoglobinica corpuscolare media).
- 2) Indici eritrocitari aggiuntivi: questi indici sono specifici solo di ADVIA e sono derivati dall'MCV e dal valore di emoglobina intracellulare: CH (contenuto emoglobinico cellulare medio) e CHCM (concentrazione emoglobinica cellulare media) sono infatti i corrispettivi dei sopra citati MCH e MCHC, ma determinati considerando solo l'emoglobina contenuta negli eritrociti.

## **Che differenza c'è allora tra MCH e CH? e tra MCHC e CHCM?**

In teoria non c'è differenza e il significato clinico delle loro alterazioni è lo stesso, così come il loro utilizzo per discriminare le varie forme di alterazioni eritrocitarie (macrocitosi, microcitosi, ipocromia, ipercromia, ecc.). Tuttavia, siccome CH e CHCM vengono derivati dalla reale emoglobina intra-eritrocitaria, sono molto meno influenzati da fattori quali emolisi e lipemia, che comunemente sono cause di incrementi artificiali di MCHC (ipercromia).

## SCOPRIAMO I SEGRETI DELL'EMOCROMO MYLAV PARTE 3°

di Walter Bertazzolo



Cari colleghi, vi siete mai chiesti cosa significano quelle sigle con la “W” che immediatamente seguono gli indici eritrocitari nei nostri emocromi?

Cercherò di spiegarlo con questo nuovo blog di aggiornamento ematologico.

La W sta per “width” ovvero ampiezza e i tre acronimi indicano quindi la variabilità dei volumi eritrocitari (RDW), del contenuto (CHDW) e della concentrazione (HDW) intra-eritrocitarie di emoglobina.

Questi tre indicatori tendono quindi ad aumentare allorché ci sia difformità di volumi degli RBC e del loro contenuto emoglobinico. Ciò si può verificare tanto nelle forme di rigenerazione midollare (es. anemie rigenerative) che di diseritropoiesi (es. anemie carenziali, patologie midollari primarie, ecc.).

**RDW:** Red Cell Distribution Width.

Rappresenta l'ampiezza della distribuzione dei volumi degli eritrociti (MCV) e come tale è un indicatore di anisocitosi.

Più la gaussiana della distribuzione degli MCV è a base larga, più l'RDW è elevato e di conseguenza l'anisocitosi è accentuata.

### RBC Volume histogram (normal sample)

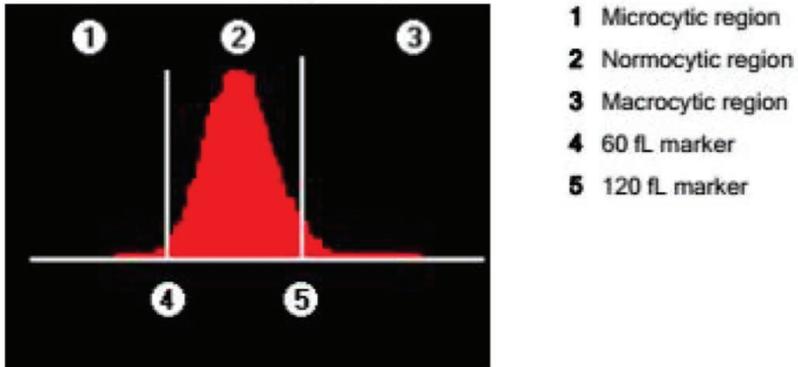


Figura 1 – RDW esempio di distribuzione normale.

### RBC Volume histogram (anisocytosis)

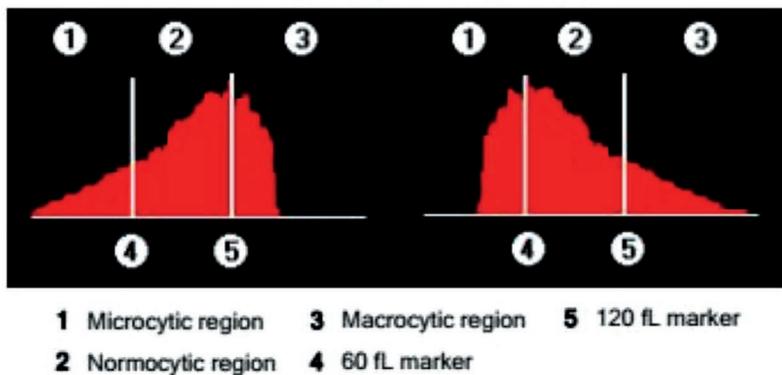
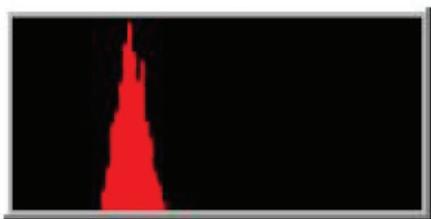


Figura 2 – Due esempi di anisocitosi associate ad un aumento dell'RDW.

**CHDW:** Cellular Hemoglobin Distribution Width.

Rappresenta la variabilità nel contenuto di emoglobina dei singoli eritrociti. Indica cioè quanto è variabile il contenuto assoluto di emoglobina nei vari eritrociti ed è quindi derivato dalla curva del CH (contenuto cellulare di emoglobina), che in condizioni normali ha una forma gaussiana.

### RBC CH Histogram



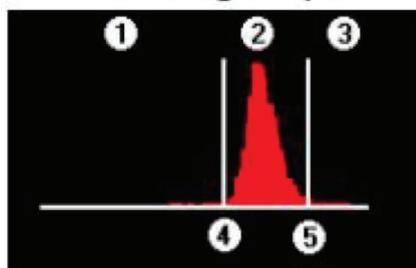
The RBC CH (cellular hemoglobin) histogram represents the distribution of red blood cells by the amount of hemoglobin present in each cell independent of cell volume.

Figura 3 – CHDW, curva normale.

**HDW:** Hemoglobin Distribution Width.

Rappresenta l'ampiezza della distribuzione della concentrazione di emoglobina negli eritrociti. In parole povere indica quanto è variabile la concentrazione di emoglobina tra i vari eritrociti e quindi quanto gli RBC del campione si allontanano da una condizione di normocromia (con un aumento quindi delle frazioni di RBC ipocromici e/o ipercromici). Anche in questo caso la distribuzione normale ha una forma gaussiana:

### RBC HC histogram (normal sample)

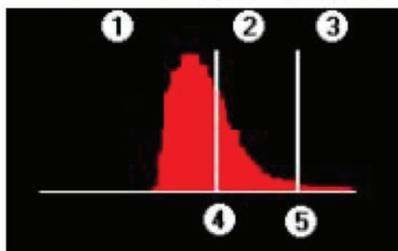


- 1 Hypochromic region
- 2 Normochromic region
- 3 Hyperchromic region
- 4 28 g/dL marker
- 5 41 g/dL marker

Figura 4 – HDW, curva normale.

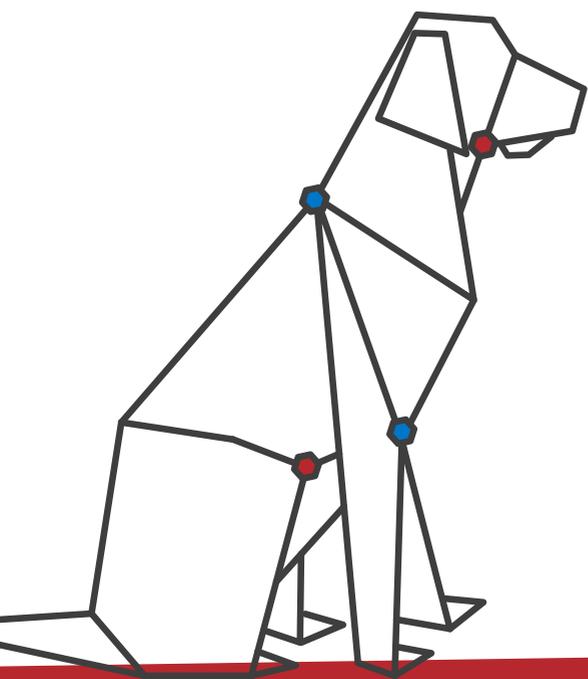
In presenza di eritrociti contenenti concentrazioni molto variabili di emoglobina, la distribuzione apparirà distorta e quindi l'HDW aumentato (notevole aumento degli RBC ipocromici).

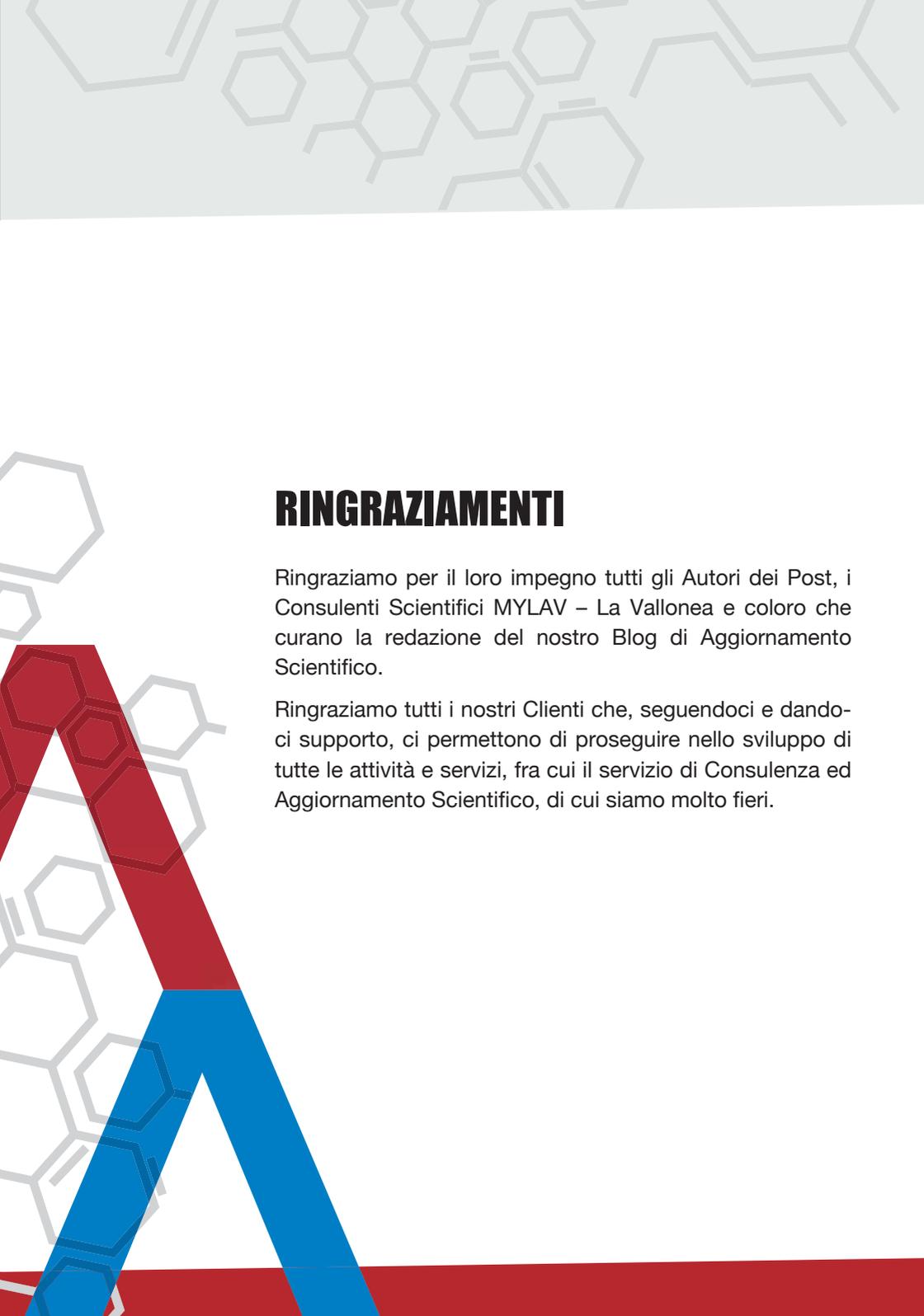
### RBC HC histogram (hypochromic sample)



- 1 Hypochromic region
- 2 Normochromic region
- 3 Hyperchromic region
- 4 28 g/dL marker
- 5 41 g/dL marker

Figura 5 – Notevole aumento degli RBC ipocromici.



The page features a decorative background with faint, light gray chemical structures (hexagons and pentagons) scattered across the top and left sides. A large, stylized letter 'A' is positioned on the left side, composed of a red upper section and a blue lower section. The text is centered on the right side of the page.

## **RINGRAZIAMENTI**

Ringraziamo per il loro impegno tutti gli Autori dei Post, i Consulenti Scientifici MYLAV – La Vallonea e coloro che curano la redazione del nostro Blog di Aggiornamento Scientifico.

Ringraziamo tutti i nostri Clienti che, seguendoci e dandoci supporto, ci permettono di proseguire nello sviluppo di tutte le attività e servizi, fra cui il servizio di Consulenza ed Aggiornamento Scientifico, di cui siamo molto fieri.

# INDICE

- 8** Esame del midollo osseo - Parte I: quando e perché eseguire una biopsia midollare?

---

- 11** Esame del midollo osseo - Parte II: come eseguire un campionamento corretto

---

- 16** Esame del midollo osseo - Parte III: come eseguire uno striscio perfetto

---

- 19** Come preparare correttamente le citologie da Lavaggio Bronco-Alveolare (BAL)

---

- 22** Le colorazioni citochimiche/istochimiche - Parte 1: lo Ziehl-Neelsen

---

- 24** Le colorazioni citochimiche/istochimiche - Parte 2: la Grocott

---

- 26** Le colorazioni citochimiche/istochimiche - Parte 3: il PAS

---

- 28** Le colorazioni citochimiche/istochimiche - Parte 4: l'Alcian-PAS

---

- 30** Le colorazioni citochimiche/istochimiche - Parte 5: il rosso Congo

---

- 32** Cortisolo basale nella diagnosi di ipoadrenocorticismo canino: quando può essere utile?

---

- 36** Perché testare gli ormoni sessuali nel cane e nel gatto?

---

- 43** Ipertiroidismo felino e insufficienza renale

---

- 47** Come i farmaci influenzano i test di funzionalità tiroidea nel cane

---

- 49** Test di clonalità linfoide: alcune domande e risposte per capire di cosa si tratta, come usarlo e come interpretarlo

---

- 52** Speranza per i mastocitomi del cane in stadio iv

---

- 54** Biopsie ossee: quando il lavoro di squadra è essenziale

---

- 57** Leishmaniosi canina: come sfruttare al massimo gli esami di laboratorio

---

- 70** La diagnosi di infezione da FIV e FeLV: istruzioni per l'uso

---

- 74** Filariosi cardiopolmonare canina - Le linee guida internazionali

---

- 76** Filariosi cardiopolmonare felina - Le linee guida internazionali
- 
- 78** PCR: dove trovo l'agente eziologico?
- 
- 80** Domande e risposte frequenti sull'encefalitozoonosi del coniglio
- 
- 83** Pappagalli e Chlamydia Psittaci
- 
- 86** Lipidosi glomerulare renale negli schanuzer nani
- 
- 89** Il dosaggio dell'LDH nei versamenti cavitari
- 
- 91** Obesità ed esami di laboratorio nel cane
- 
- 92** Ma i levrieri sono veramente dei cani?
- 
- 94** Come e quando eseguire un'emocoltura
- 
- 97** Eritrocitosi: che fare?
- 
- 100** Trombocitosi: che fare?
- 
- 103** Scopriamo i segreti dell'emocromo MyLav - Parte 1°
- 
- 104** Scopriamo i segreti dell'emocromo MyLav - Parte 2°
- 
- 106** Scopriamo i segreti dell'emocromo MyLav - Parte 3°
- 

