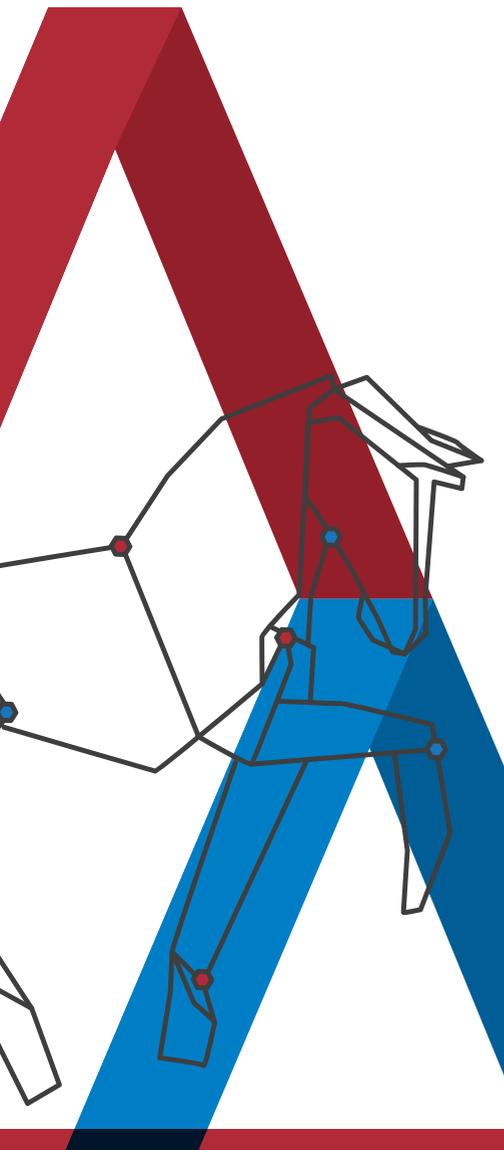


**MYLAV**<sup>®</sup>  
Laboratorio La Vallonea  
Il laboratorio dei **clinici** per i **clinici**



# MYLAV BOOK 2019

AGGIORNAMENTO SCIENTIFICO

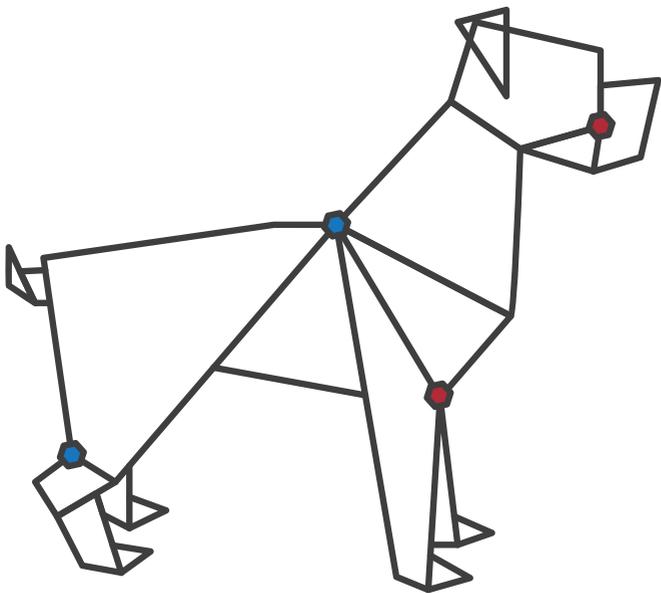
A cura di  
**Walter Bertazzolo e Ugo Bonfanti**

Tutti gli Autori dei Post sono  
Consulenti MYLAV

Collana editoriale  
“Le pillole di scienza”  
realizzata da MYLAV - LA VALLONEA  
Vol. 3 anno 2019

Tratto dal Blog [MYLAV](#)







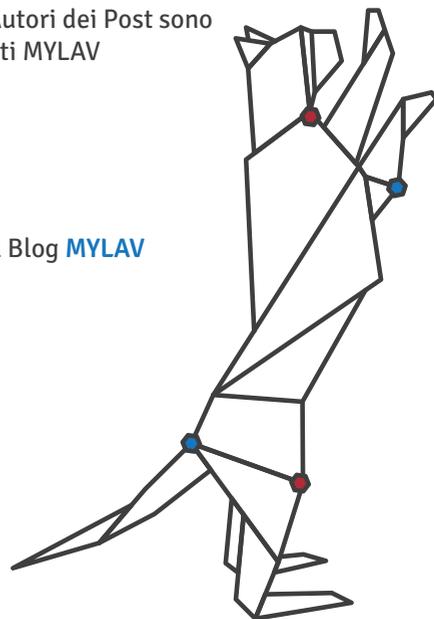
# MYLAV BOOK 2019

AGGIORNAMENTO SCIENTIFICO

A cura di  
**Walter Bertazzolo e Ugo Bonfanti**

Tutti gli Autori dei Post sono  
Consulenti MYLAV

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. Francesco Carrani  
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.ssa Selina Iussich  
Dr. Federico Leone  
Dr.ssa Laura Marconato  
Dr. Domenico Multari  
Dr.ssa Luisa Vera Muscatello  
Dr.ssa Teresa Bruna Pagano  
Dr. Luca Pazzini  
Dr. Gustavo Picci  
Dr.ssa Maria Carmela Pisu  
Dr.ssa Federica Rossi  
Dr.ssa Giliola Spattini  
Dr. Marco Tecilla  
Dr. Giovanni Tortorella  
Dr. Luigi Venco

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

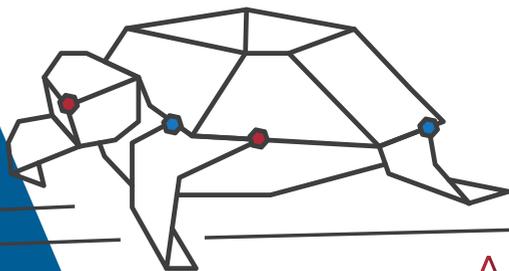


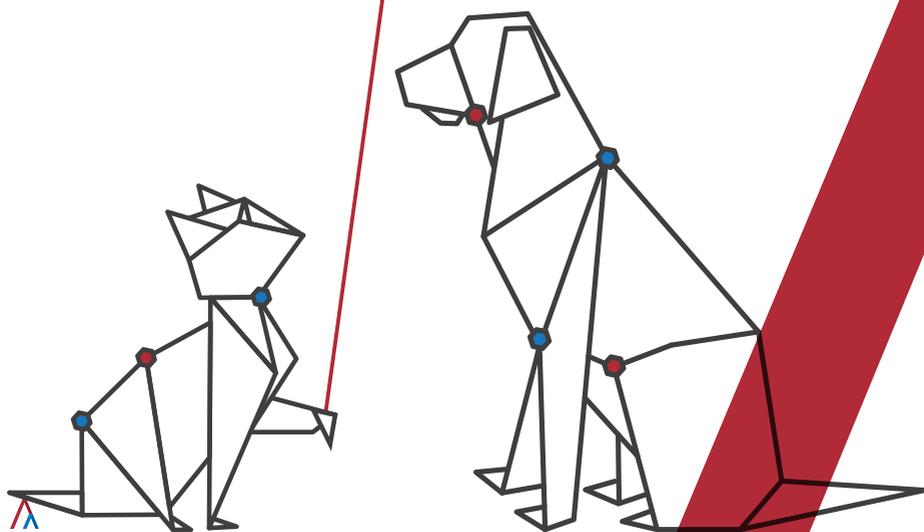
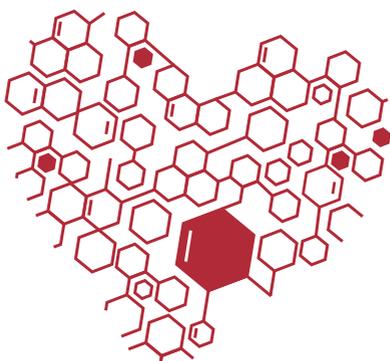
**MYLAV CONSULENZA**

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 **MYLAV BOOK 2019** “Aggiornamento Scientifico in Pillole” della collana editoriale “Le Pillole di scienza” giunta al Volume 3°.

MYLAV Book è pubblicato in versione **e-Book e AudioBook** e raccoglie i più interessanti “Post di aggiornamento scientifico” pubblicati sul nostro Blog MYLAV nell’anno precedente.

Il **Blog MYLAV** ([www.mylavblog.net](http://www.mylavblog.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 citologia 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 MyLav e Collaboratori.

In versione e-Book e Audiobook.

*Dir. Resp. Isidoro Grillo*

## **NUOVO POSSIBILE METODO PER IL MONITORAGGIO TERAPEUTICO DELLA SINDROME DI CUSHING NEL CANE**

di Federico Fracassi



Un gruppo di lavoro della Società Europea di Endocrinologia Veterinaria (ESVE) in collaborazione con Dechra® ha sviluppato un possibile nuovo metodo di monitoraggio terapeutico per i cani con Sindrome di Cushing in terapia con trilostano (Vetoryl®). Questo nuovo metodo prevede la misurazione del cortisolo sierico basale, misurato subito prima della somministrazione del trilostano del mattino (momento nel quale il trilostano del giorno precedente sta agendo al minimo).

Se si usa questo metodo di monitoraggio è essenziale che il dato laboratoristico venga integrato da una attenta anamnesi e si esegua un accurato esame fisico, sia



per rilevare la persistenza dei segni clinici da Sindrome di Cushing ma soprattutto per rilevare segni da Morbo di Addison iatrogeno.

Il cortisolo pre-trilostano considerato ottimale dovrebbe essere compreso fra 1.4 e 5 mcg/dl (questi range valgono esclusivamente se le misurazioni vengono effettuate con la metodica a chemio-luminescenza, Immulite®).

## CORTISOLO PRE-VETORYL®: UN SALTO IN AVANTI NEL MONITORAGGIO DELLA TERAPIA CON VETORYL®

Nuova metodica creata e sviluppata da

- Ian Ramsey BVSc, PhD, DSAM, Dipl. ECVIM-CA®, FHEA, MRCVS.
- Federico Fracassi DVM, PhD, Dipl. ECVIM-CA®.
- Nadja Sieber-Ruckstuhl PhD, Dr. med. vet, Dipl. ACVIM, Dipl. ECVIM-CA®.

### **Anamnesi ed esame clinico**

L'aspetto più importante che si deve sempre indagare quando un cane è in terapia con VETORYL®, è la valutazione assieme al proprietario su quale sia la risposta del cane alla terapia quando è a casa. Questo importante aspetto del monitoraggio clinico, spesso trascurato, è fondamentale per ottenere compliance, sicurezza e un ottimo risultato terapeutico.

I proprietari che in qualsiasi momento riferiscano che il loro cane sta male, dovrebbero portarlo per un controllo affinché possa essere escluso l'ipoadrenocorticismo iatrogeno (attraverso esami del cortisolo, ematologici, biochimici e degli elettroliti).

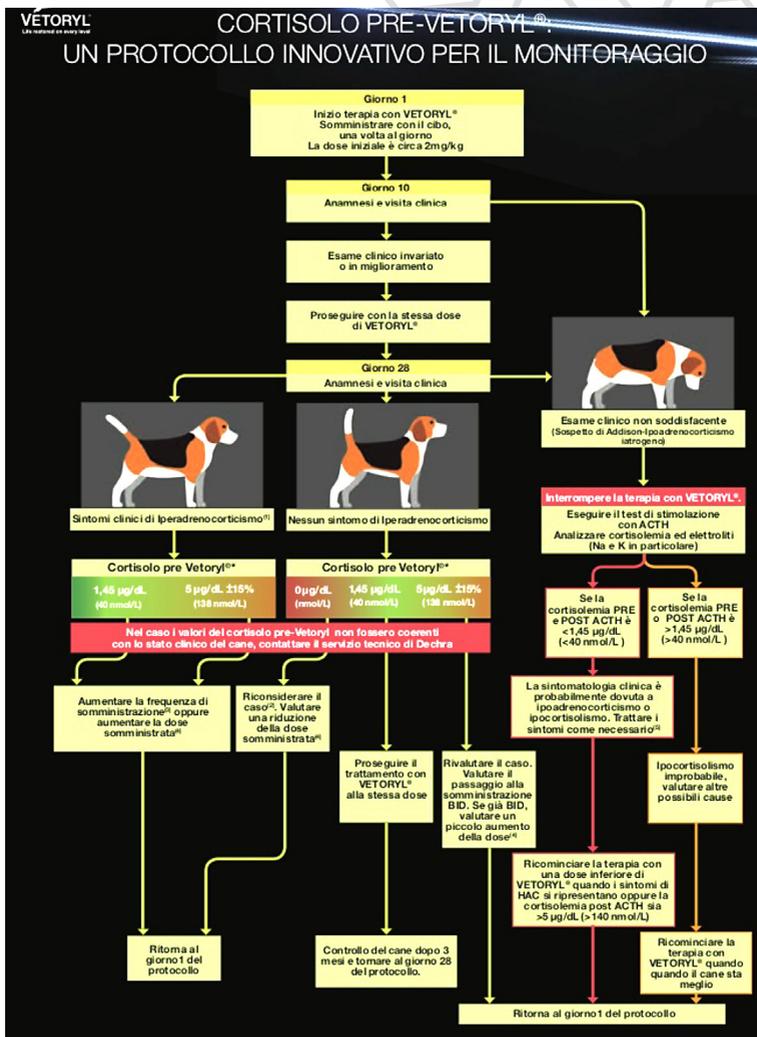
### **Quando e come organizzare il test**

- Fissare l'appuntamento all'orario in cui il paziente usualmente assume VETORYL®, al massimo fino a due ore dopo.

- Se questo orario è incompatibile con quello di una visita (per esempio le 6 del mattino), chiedere al proprietario di spostare l'ora di somministrazione del giorno prima ad un'orario più conveniente (per esempio le 9 del mattino).
- Accertarsi che quella mattina il cane non abbia ancora assunto VETORYL® e non abbia avuto stress particolari (per es. vomito, traumi, ecc).
- Raccogliere l'anamnesi, visitare il cane, cercare eventuali sintomi di iperadrenocorticismo.

### **Campionamento per il test**

- Prelevare il campione preferibilmente prima della visita.
- 1-2 ml di sangue con anticoagulante, o sierato.
- Una volta sierato, può essere conservato per una settimana.
- Inviare i campioni al laboratorio di fiducia, gli autori consigliano l'utilizzo di una Siemens IMMULITE® o un metodo validato dal confronto con questo strumento.



1) PU/PD, polifagia, affanno e letargia dovrebbero sparire o migliorare in un mese. Alopecia e addome a botte possono richiedere 3-6 mesi per sparire.

2) Rivalutare l'anamnesi e considerare il test di stimolazione con ACTH pre-Vetoryl®.

3) Se i sintomi non sono adeguatamente controllati nell'arco delle 24 ore intercorrenti tra due somministrazioni, si può aumentare la dose totale del 50% e dividerla in due somministrazioni uguali al mattino e alla sera.

4) Utilizzare le possibili combinazioni di capsule di Vetoryl® esistenti per aumentare o diminuire la dose giornaliera necessaria.

5) Desametasone per il trattamento dell'ipocortisolemia, soluzione fisiologica EV per trattare la disidratazione e l'iperoctassiemia. In alternativa si può utilizzare idrocortisone CRI e soluzione fisiologica EV.

\* Questi valori sono stati ottenuti utilizzando analizzatori Siemens IMMULITE® 1000/2000; altri strumenti e metodi di analisi potrebbero dare risultati differenti, in caso di dubbio consultare il proprio laboratorio di fiducia.

## AGGIORNAMENTO SULL'IPERTIROIDISMO FELINO ALLO SCIVAC DI RIMINI

di Federico Fracassi



Al recente congresso nazionale SCIVAC di Rimini il Prof. Federico Fracassi, nostro consulente in endocrinologia e medicina interna, ha tenuto una lezione di aggiornamento sull'ipertiroidismo felino, sottolineando sia le conoscenze ormai consolidate, sia quelle più recentemente acquisite. Ecco di seguito i punti salienti della sua presentazione:

**1) Eziopatogenesi:** l'ipertiroidismo è emerso come problema clinico negli ultimi decenni, divenendo la più comune endocrinopatia felina. Ma quali sono le ragioni? La semplice aumentata capacità dei veterinari di rilevarlo non spiega da sola questa elevata incidenza. Sono stati individuati possibili fattori alimentari (diffusione di diete commerciali industriali in scatola, presenza di isoflavoni, ecc.), mutazioni genetiche del gene che codifica per il recettore del TSH a livello di tireociti e possibili effetti legati a sostanze contaminanti ambientali poli-clorinate e poli-brominate presenti nell'ambiente domestico.

**2) Presentazione clinica:** sebbene nel corso dei decenni i sintomi clinici classici non siano cambiati (presenza di nodulo/i tiroidei, PU/PD, dimagrimento, polifa-



gia, sviluppo di cardiopatie, ecc.), la diagnosi precoce ha modificato la frequenza con la quale tali sintomi si rilevano. Oggi, infatti, ogni volta che si valuta un gatto adulto/anziano, l'ipertiroidismo viene incluso nelle diagnosi differenziali; inoltre, la diffusione dello screening ormonale mediante misurazione del T4 ha reso molto semplice l'effettuare una diagnosi rapida.

3) **Diagnosi:** il cardine della diagnosi resta la misurazione del T4 totale, che continua a mantenere il miglior compromesso tra sensibilità e specificità, anche se la scintigrafia rappresenterebbe il gold-standard diagnostico. Recentemente è stata indagata anche la misurazione del cTSH che nel gatto ipertiroidico pre-terapia risulta quasi sempre indosabile. Un valore di cTSH rilevabile deve mettere fortemente in dubbio la diagnosi di ipertiroidismo.

4) **Terapia:** la terapia d'elezione sarebbe quella mediante iodio radioattivo, ma l'elevato costo della procedura e la scarsità di strutture che lo possono effettuare in Europa, rende questa procedura poco praticabile in Italia. La terapia medica con prodotti anti-tiroidei (es. metimazolo/carbimazolo) resta quindi la procedura più diffusa e facile da proporre. La chirurgia può essere una opzione valida, soprattutto in caso di adenomi solitari, ma bisogna considerare i rischi chirurgici e soprattutto le complicanze relative alla possibile rimozione delle paratiroidi e allo sviluppo di ipoparatiroidismo e ipotiroidismo iatrogeno.

Infine la dieta commerciale Y/D di Hill's è un'altra opzione, ma deve essere somministrata in maniera assolutamente esclusiva e, in base alle esperienze dell'autore, è più difficile mantenere il controllo dell'ipertiroidismo.

Il monitoraggio terapeutico si basa sulla misurazione del T4 totale, e recentemente è stata proposta anche la misurazione del cTSH, utile per svelare pericolose condizioni di ipotiroidismo iatrogeno.

## PERCHÉ È IMPORTANTE MISURARE L'IGF-1 NEL GATTO

di Walter Bertazzolo & Federico Fracassi



Il diabete mellito è una comune disendocrinia felina, seconda solo all'ipertiroidismo in termini di prevalenza. La diagnosi è solitamente semplice ed è basata sui classici segni clinici di dimagrimento, polifagia, poliuria/polidipsia, iperglicemia persistente e glicosuria.

Non così semplice può invece essere la gestione terapeutica, in particolare allorché il gatto diabetico presenti una patologia concomitante.



Negli ultimi anni è emerso che l'acromegalia, in particolare nei gatti anziani di sesso maschile, rappresenta una patologia endocrina tutt'altro che rara. Questa condizione è frequentemente associata al diabete mellito (dal 10% al 40% dei casi in alcuni studi) e può determinare una notevole insulino-resistenza.

Spesso la diagnosi di acromegalia viene proprio effettuata dopo aver osservato una progressiva perdita di efficacia della terapia insulinica in un gatto diabetico in terapia.

Per tale ragione è importante escludere l'acromegalia nei gatti con diabete mellito, sia in prima presentazione, che successivamente durante la terapia insulinica.

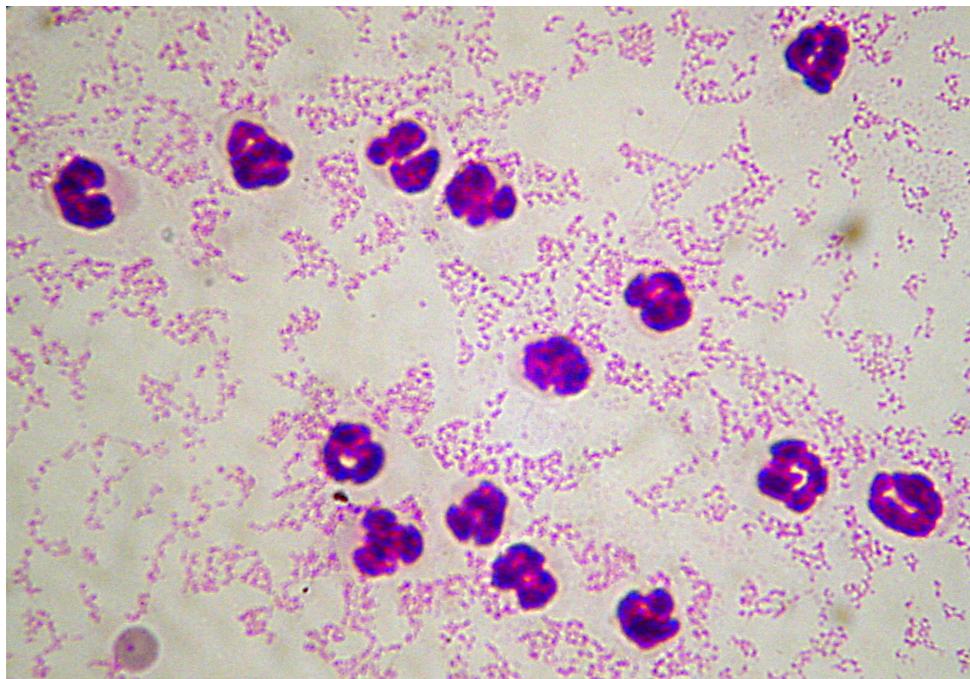
Il test diagnostico per la diagnosi di acromegalia è l'IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1) sierico: valori  $>1000$  ng/mL sono estremamente suggestivi della malattia. La misurazione di GH (Growth Hormone) ha invece una ridotta utilità diagnostica.

Va sottolineato che non tutti i gatti acromegalici, al momento della diagnosi di diabete mellito, presentano già una concentrazione di IGF-1  $>1000$  ng/mL. Infatti, per la sintesi di IGF-1 è necessaria l'insulina, pertanto circa 1/3 dei gatti acromegalici diabetici raggiunge valori di IGF-1  $>1000$  ng/mL solo dopo 4 settimane di terapia insulinica.

È importante quindi misurare l'IGF-1 in prima presentazione (in particolare nei gatti maschi anziani diabetici): in caso di valore  $<1000$  ng/mL, è necessario ripetere la misurazione dopo almeno 4 settimane di terapia insulinica.

## LA POLIARTRITE IMMUNO-MEDIATA, QUESTA SCONOSCIUTA

di Walter Bertazzolo



*Immagine 1 – Esempio di flogosi neutrofilica in un liquido sinoviale di paziente con poliartrite.*

Cari colleghi, il caso clinico della scorsa settimana mi ha dato uno spunto per parlare di una patologia, o meglio un gruppo di patologie assai frequenti quanto trascurate e sottostimate: le poliartriti immunomediate.

Quante volte ci capitano cani con sintomatologia aspecifica, febbre persistente, riluttanza al movimento e non riusciamo a trovare il bandolo della matassa?

Spesso sono soggetti giovani. Spesso hanno come uniche alterazioni di laboratorio un quadro infiammatorio aspecifico evidente agli esami ematobiochimici. Eb-



bene molti di questi pazienti sono affetti da poliartrite immunomediata, patologia sottostimata quanto comune.

Uno degli errori più comuni che vengono fatti dai clinici, è di escluderla per il semplice fatto che il paziente non zoppichi e non presenti gonfiore articolare. Questi due sintomi sono infatti spesso assenti nei cani con poliartrite.

Ancora più complesso il discorso del gatto, in quanto i felini nascondono bene il dolore e spesso l'unica manifestazione di poliartrite è la febbre e/o la riluttanza al movimento.

La diagnosi di queste patologie è basata sull'esame citologico e microbiologico dei liquidi sinoviali di articolazioni multiple.

La diagnosi è essenziale in quanto deve escludere innanzi tutto delle forme infettive batteriche (poco frequenti, che andrebbero quindi trattate con antibatterici) e deve essere seguita da una appropriata terapia immunosoppressiva.

Un'altra cosa che viene spesso sottostimata dai clinici è che la poliartrite immunomediata colpisce anche i gatti, anche se con frequenza inferiore.

Nei felini la poliartrite è spesso in forma erosiva (al contrario del cane), colpisce spesso i maschi e conduce, nelle forme croniche trascurate, a gravi alterazioni morfologiche e funzionali delle articolazioni colpite.

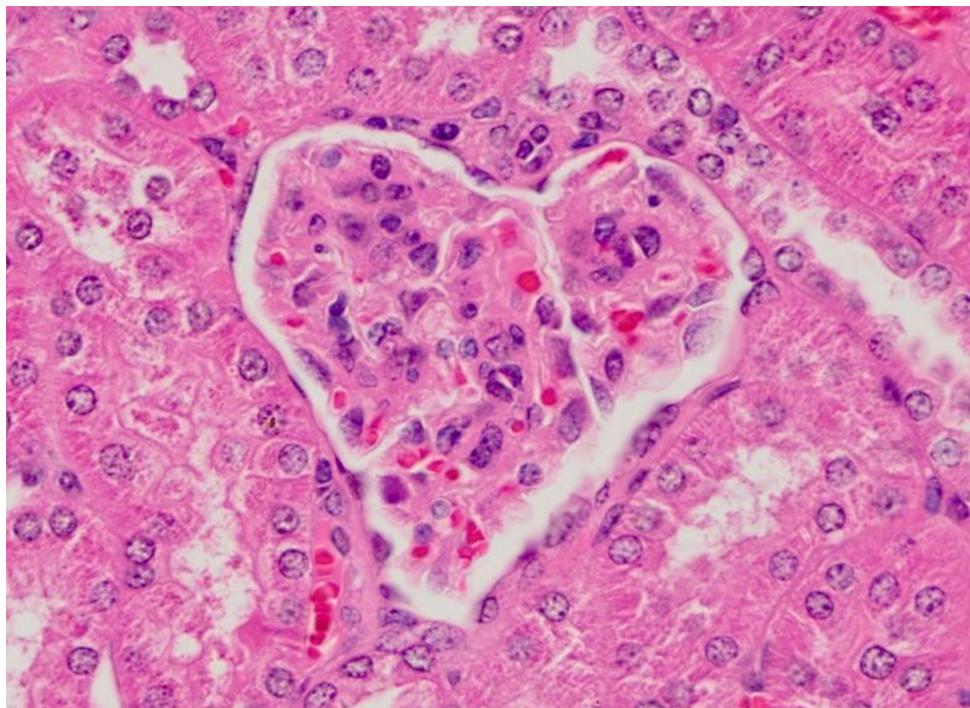
L'esame del liquido sinoviale mostra una flogosi neutrofilica asettica (vedi esempio a fianco). Dato che non è possibile essere certi di quali articolazioni risulteranno affette, è importante ricercare queste alterazioni citologiche in tutte le articolazioni campionabili mediante artrocentesi.

Quindi ricordatevi sempre di considerare questa patologia nelle vostre diagnosi differenziali, soprattutto nei pazienti con febbre di origine sconosciuta, e ricordatevi: è molto più frequente di quel che si crede, per cui siate sempre propositivi nell' eseguire le artrocentesi diagnostiche nei casi sospetti.

Allorché la diagnosi viene confermata dalla citologia e dalla negatività all'esame batteriologico, bisogna poi ricordarsi che la maggior parte di queste infiammazioni è idiopatica, la percentuale restante può essere secondaria a reazioni avverse a farmaci, a infezioni (soprattutto quelle trasmesse da vettore), a neoplasie o a enteropatie croniche. Quindi queste potenziali cause vanno indagate approfonditamente.

## COME STADIARE E GESTIRE LA PATOLOGIA RENALE CRONICA

di Walter Bertazzolo & Francesco Dondi



*Immagine 1 – L'amore per la nefrologia può venir testimoniato anche dalla forma dei glomeruli!*

Cari colleghi internisti, in occasione del congresso Nazionale SCIVAC di Arezzo, dedicato alla nefrologia, abbiamo chiesto al nostro consulente di settore, Francesco Dondi, di redigere un documento che riporti le attuali linee guida IRIS per la stadiazione e gestione terapeutica della patologia renale cronica del cane e del gatto.

## LINEE GUIDA IRIS PER LA MALATTIA RENALE CRONICA (CKD)

### Stadiazione della CKD

La stadiazione della CKD segue una corretta diagnosi e ha come obiettivo quello di facilitare un corretto monitoraggio e trattamento del paziente.

La stadiazione del paziente viene eseguita basandosi sulla valutazione della concentrazione di creatinina sierica, misurata nel paziente a digiuno, in almeno 2 occasioni. Il paziente deve essere poi “sotto-stadiato” sulla base della proteinuria e del valore di pressione arteriosa sistolica.

In funzione dello Stadio IRIS, sono fornite raccomandazioni empiriche e/o, quando possibile, basate sull’evidenza scientifica, sul trattamento che sarebbe utile impostare. Alcune indicazioni prognostiche possono essere fornite basandosi sull’esperienza clinica e tenendo conto della risposta al trattamento. I dati di letteratura a tal proposito sono scarsi.

### Dimetilarginina simmetrica (SDMA) e linee guida IRIS per la CKD

La stadiazione della CKD è ad oggi basata sulla concertazione sierica di creatinina valutata a digiuno, ma si pensa che la concentrazione di SDMA nel plasma o nel siero possa essere un marker di funzionalità renale ancora più sensibile. Se si conosce la concentrazione di SDMA, possono essere fatte alcune considerazioni aggiuntive:

- **cani o gatti adulti** con concertazioni di creatinina  $<1.4$  o  $1.6$  mg/dl, rispettivamente, ma con SDMA  $>14$   $\mu\text{g/dl}$  in modo persistente possono essere considerati come Stadio IRIS 1. Il valore di SDMA di riferimento per cani inferiori all’anno di età è  $> 16$   $\mu\text{g/dl}$ .
- In pazienti con basso *body condition score* (punteggio di condizione corporea, ovvero “Body Condition Score” - BCS) in stadio IRIS CKD 2, una SDMA  $\geq 25$   $\mu\text{g/dl}$  può indicare una sottostima del grado di disfunzione renale. Considerare di trattare il paziente come raccomandato per pazienti IRIS CKD Stadio 3.
- In pazienti con basso BCS Stadio IRIS CKD 3 con SDMA  $\geq 45$   $\mu\text{g/dl}$ , potrebbe essere sottostimata la disfunzione renale. Considerare il trattamento raccomandato per pazienti IRIS CKD Stadio 4.

## **“Sotto-stadiazione” basata sulla proteinuria**

L’obiettivo è identificare la proteinuria di origine renale, escludendo le cause di proteinuria pre e post renale.

L’utilizzo del dispstick urinario può dare risultati falsi positivi; considerare quindi sempre metodiche di screening più specifiche.

Il rapporto tra le proteine urinarie e la creatinina urinaria (UPC o PU/CU) deve essere sempre valutato dopo aver escluso infezioni del tratto urinario, emorragie o pigmenturia di altra natura e dopo aver escluso disproteinemie tramite quantificazione delle proteine plasmatiche (rare). Idealmente, la sottostadiazione basata sulla proteinuria dovrebbe essere eseguita sulla base di almeno 2 campioni di urine raccolti in un arco di tempo di almeno 2 settimane.

Pazienti con proteinuria borderline in modo persistente dovrebbero essere rivalutati nell’arco di 2 mesi e conseguentemente riclassificati.

Animali con UPC classificati come non proteinurici o proteinurici borderline potrebbero essere “microalbuminurici” o meglio “albuminurici”. Il significato della albuminuria di lieve entità nel predire lo sviluppo di una nefropatia futura, non è ad oggi conosciuto. La raccomandazione IRIS è quella di continuare a monitorare il valore di proteinuria fino ad un chiaro inquadramento del paziente.

La proteinuria tende a ridursi con l’aggravamento della disfunzione renale, animali in Stadio 3 e 4 possono essere meno proteinurici.

Il rapporto UPC o PU/CU può essere monitorato ad intervalli, per valutare la risposta al trattamento, ridurre l’ipertensione glomerulare, la pressione di filtrazione glomerulare e quindi la proteinuria.

## **“Sotto-stadiazione” sulla pressione arteriosa sistolica**

Il paziente deve essere approcciato correttamente per la misurazione della pressione arteriosa e abituato, per quanto possibile, alla metodica di misurazione. È necessario, inoltre, eseguire più misurazioni. La stadiazione deve essere eseguita dopo varie valutazioni del valore pressorio, preferibilmente in giorni differenti, ma può essere accettabile se basata su misurazioni pressorie eseguite a distanza di alcune ore (almeno due) durante la stessa giornata.



La “sotto-stadiazione” basata sulla pressione arteriosa tiene conto del valore pressorio sistolico (Systolic Arterial Pressure - SAP - che è connessa al grado di rischio di danno agli organi target), dell’evidenza di un danno agli organi target già presente e delle complicazioni ad esso legate.

Alcune razze di cani tendono ad avere un valore pressorio arterioso più alto, in modo particolare i levrieri. Se fossero disponibili, sarebbe meglio utilizzare intervalli di riferimento specifici per le diverse razze.

La classificazione del rischio di danno d’organo nelle razze con pressione più elevata dovrebbe essere modificata, come di seguito:

- rischio minimo: sistolica (SAP) < 10 mmHg al di sopra dell’intervallo di riferimento specie-specifico.
- Rischio basso: SAP 10-20 mmHg al di sopra dell’intervallo di riferimento specie-specifico.
- Rischio moderato: SAP 20-40 mmHg al di sopra dell’intervallo di riferimento specie-specifico.
- Rischio elevato: SAP > 40 mmHg oltre l’intervallo di riferimento specie-specifico.

In assenza di danno d’organo ipertensivo evidente, è fondamentale considerare un aumento pressorio confermandolo in misurazioni ripetute, così come avviene per la proteinuria. In questo caso, se confermato, il dato risulta di notevole importanza clinica.

L’aumento pressorio persistente deve essere valutato tramite varie misurazioni, secondo le tempistiche riportate:

- iperteso (SAP da 160 a 179 mmHg): il dato deve essere rivalutato e confermato in 1- 2 mesi con misurazioni ripetute.
- Gravemente iperteso (SAP  $\geq$  180 mmHg): il dato deve essere riconfermato più rapidamente, in 1-2 settimane e con misurazioni ripetute,

### **Revisione della stadiazione e sotto-stadiazione dopo il trattamento**

La stadiazione e la sotto-stadiazione devono essere modificate nel momento in cui avvengano dei cambiamenti. Per esempio, un aumento sostanziale nella con-

centrazione di creatinina può giustificare la collocazione in un più alto stadio, che riflette meglio la nuova situazione.

Lo stesso vale nel caso in cui il paziente sia trattato con farmaci anti-ipertensivi (e/o anti-proteinurici): la classificazione deve essere rivista in modo da riflettere meglio il nuovo valore pressorio o di proteinuria, specificando che la nuova classificazione è verosimilmente condizionata dal trattamento (animale in terapia).

Stadio	Creatinina sierica mg/dl		Commenti
	Cane	Gatto	
A rischio di CKD	<1.4	<1.6	Pazienti maggiormente a rischio di sviluppare CKD, sulla base dei reperti anamnestici (per esempio: esposizione a farmaci nefrotossici, razza, vita in area endemica per alcune malattie infettive, età avanzata)
1	<1.4	<1.6	Paziente non iperazotemico. Sono presenti altre alterazioni "renali" quali per esempio: <ul style="list-style-type: none"> <li>• incapacità di concentrare le urine in assenza di cause non-renali identificabili</li> <li>• alterazioni alla palpazione renale o alterazioni renali riscontrabili con l'ecografia</li> <li>• alterazioni alla palpazione renale o alterazioni renali riscontrabili con l'ecografia</li> <li>• proteinuria di origine renale</li> <li>• esiti biotipici renali anormali,</li> <li>• aumento della concentrazione di creatinina sierica in più campionamenti successivi (ma all'interno dell'intervallo di riferimento)</li> </ul>
2	1.4-2.0	1.6-2.8	Iperazotemia lieve (il limite inferiore dell'intervallo IRIS spesso cade all'interno dell'intervallo di riferimento di normalità per molti laboratori); nonostante la bassa sensibilità della creatinina come test di screening, animali con concentrazioni di creatinina vicina al limite superiore spesso hanno una ridotta funzionalità escretoria renale. Segni clinici generalmente blandi o assenti.
Stadio	Creatinina sierica mg/dl		Commenti
3	2.1-5.0	2.9-5.0	Iperazotemia moderata. Possono essere presenti segni clinici extrarenali, con gravità variabile. Se non sono presenti segni clinici, il paziente può essere considerato uno Stadio 3 iniziale, mentre la presenza di più segni clinici o gravi segni clinici sistemici, possono far classificare il paziente come Stadio 3 avanzato.
4	>5	>5	Segni clinici di solito presenti, maggior rischio di sviluppare segni clinici sistemici o crisi uremica

*Tabella 1 - Stadiazione cane e gatto in base alla creatinina sierica.*

UPC o PU/CU		Sotto-stadio
Cane	Gatto	
<0.2	<0.2	Non proteinurico
0.2-0.5	0.2-0.4	Proteinuria borderline
>0.5	>0.4	Proteinurico

Tabella 2 - Sotto stadiazione cane e gatto in base alla proteinuria.

Pressione arteriosa sistolica (SAP)	Sottostadio	Rischio di danno d'organo futuro
<140	Normoteso	Minimo
140-159	Ipertensione borderline	Basso
160-179	Iperteso	Moderato
≥180	Gravemente iperteso	Alto

Tabella 3 - Sotto stadiazione in base alla pressione arteriosa sistolica (SAP).

## RACCOMANDAZIONI IRIS PER IL TRATTAMENTO DEI PAZIENTI CKD CANINI

Tutti i trattamenti per la CKD devono essere individualizzati. Le raccomandazioni riportate sono punti di partenza utili per la maggioranza dei cani, in base allo Stadio con cui è stata classificata la loro malattia renale cronica. I pazienti devono essere monitorati in modo seriale e il trattamento dovrebbe essere adattato in base alla risposta al trattamento stesso. Come già riportato, la stadiazione segue la diagnosi di CKD: un aumento della sola creatinina non è sufficiente per emettere una diagnosi di malattia renale cronica, ma può essere legato ad altre condizioni che transitoriamente riducono la funzione renale.

Il trattamento raccomandato è definito in base a due categorie di pazienti:

- pazienti con una lenta progressione della CKD e che preservano per lungo tempo la rimanente funzionalità renale.
- Pazienti in cui cercare di migliorare la qualità di vita del cane, riducendo segni clinici e sintomi della CKD.

Solitamente nei primi stadi di CKD (Stadio 1 e 2) sono presenti pochi segni clinici extra-renali e l'obiettivo terapeutico è quello di rallentare la progressione della

malattia. A partire dallo Stadio 3 in avanti diventano più frequenti e gravi i segni clinici. Pertanto, nel 4° Stadio il trattamento diviene più che altro sintomatico, migliorare la qualità di vita diviene più importante che ridurre la progressione della CKD.

## **STADIO 1**

1. Riconoscere e sospendere tutti i farmaci potenzialmente nefrotossici (sempre quando possibile).
2. Identificare e trattare qualsiasi causa di danno pre-renale (ipoperfusione renale/ipotensione, disidratazione) o post-renale (ostruzione del tratto urinario).
3. Ricercare la causa eziologica ed escludere qualsiasi condizione trattabile, come es. pielonefriti (ogni infezione del tratto urinario dovrebbe essere considerata come una potenziale pielonefrite e adeguatamente trattata), nefrolitiasi (radiografia e/o ecografia), altre malattie.
4. Misurare la pressione arteriosa e quantificare il rapporto proteine totali urinarie/creatinina urinaria (UPC o PU/CU).

### **Gestire la disidratazione: (a)**

In questi pazienti, la capacità di concentrare le urine è spesso alterata e quindi bisogna:

- correggere disidratazione clinica/ipovolemia con la fluidoterapia EV o SC (quando necessaria).
- Garantire acqua fresca sempre disponibile ed incentivare il consumo di acqua.

### **Ipertensione arteriosa (b)**

Il valore pressorio al di sopra del quale si può presentare un danno d'organo non è noto, ma è proporzionale alla gravità dell'ipertensione. L'obiettivo è quello di ridurre la SAP <160 mmHg per limitare il rischio di danno agli organi target (sistema nervoso centrale, occhio, cuore).



In pazienti considerati a rischio per lo sviluppo di danno d'organo e con valori pressori >160 mmHg in modo persistente, può essere già preso in considerazione il trattamento anti-ipertensivo.

(N.B. Seguire le indicazioni riportate nella stadiazione della CKD per decidere le tempistiche di monitoraggio pressorio)

Se e quando sono presenti segni di danno agli organi target, non è necessario dimostrare un aumento persistente della SAP per definire un paziente iperteso. Ridurre la SAP è un obiettivo a lungo termine e deve essere raggiunto lentamente e in modo duraturo evitando bruschi decrementi che potrebbero esitare in fenomeni ipotensivi o comunque ridurre la perfusione renale in paziente nefropatico cronico.

### **Gestire l'ipertensione:**

1. ridurre il consumo di sodio con la dieta. Negli animali non esistono evidenze scientifiche che supportino che la riduzione del sodio assunto riduca la pressione; la riduzione del consumo di sodio dovrebbe essere raggiunta gradualmente in associazione all'utilizzo della terapia farmacologica.
2. Inibitori dell'enzima di conversione dell'angiotensina (ACEI, es.: benazepril) a dosaggio standard.
3. Duplicare il dosaggio di ACEI.
4. Combinare l'azione degli ACEI con i bloccanti dei canali del calcio (CCB, es.: amlodipina), soprattutto se l'ipertensione è grave.
5. Combinare l'azione degli ACEI e/o CCB con i bloccanti dei recettori per l'angiotensina (ARB, es.: telmisartan) e/o idralazina.

Fare attenzione a non introdurre ACEI/CCB (con o senza ARB), se il paziente non è adeguatamente idratato (vedi effetti collaterali degli inibitori del sistema renina angiotensina aldosterone).

### **Monitoraggio del trattamento ipertensivo:**

I cani ipertesi richiedono trattamenti per tutta la vita, ma la terapia spesso necessita di modificazioni. Il monitoraggio seriale è fondamentale. Dopo aver raggiunto la "stabilizzazione", il monitoraggio dovrebbe avvenire ogni 3 mesi.

SAP < 120 (130) mmHg e/o debolezza o tachicardia indicano uno stato ipotensivo (per un paziente nefropatico) che dovrebbe essere evitato.

Con la riduzione della SAP può verificarsi un incremento nella concentrazione della creatinina sierica (aumento di 0.5 mg/dl); incrementi maggiori possono suggerire effetti collaterali legati ai farmaci che si stanno utilizzando.

Un aumento progressivo del valore di creatinina può invece indicare una progressione della malattia/danno renale.

### **Proteinuria: (c)**

In presenza di cani in Stadio 1 IRIS con PU/CU >0.5, dovrebbero essere ricercate le potenziali cause che possono determinare proteinuria (vedi punto 1 e 2 sotto), che dovrebbe essere trattata con adeguate misure anti-proteinuriche (vedi punti 3, 4, 5, 6 sotto).

Cani con proteinuria borderline (PU/CU compreso tra 0.2 e 0.5) dovrebbero essere strettamente monitorati (vedi punti 1 e 6).

1. Ricercare tutte le potenziali cause associate a proteinuria che possano essere trattate.
2. Considerare eventualmente la biopsia renale, come mezzo per identificare patologie sottostanti.
3. Impostare una dieta renale ed eventualmente somministrare ACEI.
4. Se la proteinuria non è controllata, combinare la dieta e ACEI con ARB.
5. Somministrare terapia antiaggregante piastrinica (se l'albumina sierica è < 2.0 g/dl).
6. Monitorare la risposta al trattamento e la progressione della patologia:
  - concentrazione creatinina stabile e riduzione del PU/CU = Buona risposta.
  - Aumento della creatinina sierica e/o aumento dell' PU/CU = Progressione della patologia.

Le terapie impostate possono essere mantenute per tutta la vita, a meno che la patologia sottostante non sia in risoluzione, in questo caso può essere considerata una riduzione della dose tenendo monitorato il PU/CU.

## STADIO 2

### Valutare i punti 1, 2, 3, 4 riportati nello Stadio1.

5. Introdurre la dieta renale: dovrebbe essere più semplice nei primi stadi di CKD poiché l'animale solitamente è ancora appetente.

**Gestire la disidratazione: vedi (a)**

**Ipertensione arteriosa: vedi (b)**

**Proteinuria: vedi (c)**

In presenza di cani in stadio 2 con PU/CU > 0.5, dovrebbero essere ricercate le potenziali cause che possono determinare proteinuria (vedi punto 1 e 2 dello stadio 1), che dovrebbero essere adeguatamente trattate con misure anti-proteinuriche (vedi punti 3, 4, 5, 6 riportati nello Stadio 1).

### **Ridurre l'assunzione di fosforo con la dieta: (d)**

L'evidenza scientifica suggerisce di ridurre la quantità di fosforo con la dieta mantenendo una concentrazione di fosforo sierica < 4.5 mg/dl, ma maggiore di 2.7 mg/dl. Al fine di raggiungere questo obiettivo:

1. restrizione dietetica di fosforo (dieta renale).
2. Se la concentrazione sierica di fosforo rimane >4.5 mg/dl nonostante la restrizione dietetica, somministrare dei chelanti del fosforo (es: idrossido di alluminio, calcio carbonato) ad effetto, iniziare con un dosaggio di 30-60 mg/kg/giorno diviso per il numero di pasti, mescolandolo con l'alimento. La dose necessaria può variare in base alla quantità di fosforo assunta con la dieta e lo stadio CKD. Monitorare la concentrazione di calcio sierico e fosforo ogni 4-6 settimane, fino a che non sia stabile, poi ogni 12 settimane.

La presenza di debolezza muscolare generalizzata e microcitosi, possono essere effetti secondari alla tossicità da alluminio, nel caso in cui si utilizzi un chelante contenente alluminio. L'ipercalcemia dovrebbe essere evitata, talvolta è necessario combinare al calcio carbonato l'idrossido di alluminio.

### **Acidosi metabolica: (e)**

Se il paziente presenta acidosi metabolica ( $\text{HCO}_3$  o  $\text{CO}_2$  totale  $< 18\text{mmol/l}$ ) una volta introdotta la dieta renale, somministrare bicarbonato di sodio (o citrato di potassio se ipokaliemico) ad effetto, per mantenere i bicarbonati o  $\text{CO}_2$  totale tra  $18\text{-}24\text{ mmol/l}$ .

### **Indicazioni aggiuntive per il paziente in stadio 2:**

Se l' $\text{SDMA}$  risulta aumentata  $> 25\mu\text{g/dl}$ , considerare l'eventualità di trattarlo come un paziente in Stadio 3.

### **STADIO 3**

I cani in stadio 3 possono avere una presentazione clinica variabile, dall'assenza di segni clinici a segni clinici extra renali marcati.

Il trattamento descritto per gli Stadi 1 e 2 è valido nei cani in stadio 3 non sintomatici, mentre per quelli in stadio 3 avanzato diventa importante migliorare la qualità di vita, gestendo la disidratazione, la nausea, il vomito, l'anemia e l'acidosi.

### **Valutare i punti 1, 2, 3, 4, 5 ripostati nello Stadio 2**

**Gestire la disidratazione: vedi (a)**

**Ipertensione sistemica: vedi (b)**

**Proteinuria: vedi (c)**

**Ridurre l'assunzione di fosforo con la dieta: vedi (d)**

L'evidenza scientifica riconosce l'utilizzo cosciente del calcitriolo (da  $1,5$  a  $3,5\text{ ng/kg/die}$ ) come fattore in grado di prolungare l'aspettativa di vita in pazienti in Stadio 3, quando la fosfatemia è controllata e il calcio ionico e il PTH vengono o possono essere monitorati.

**Acidosi metabolica: vedi (e)**

### **Indicazioni aggiuntive per il paziente in stadio 3:**

- Considerare di trattare l'anemia, nel caso in cui condizioni la qualità di vita del paziente, tipicamente questo accade quando il PCV è < 20%; l'eritropoietina ricombinante è il trattamento più efficace, ma non è approvata per l'utilizzo in veterinaria; viene consigliato l'utilizzo di darbepoietina, perché meno antigenica dell'epoietina alfa; non è provato l'effetto positivo dei corticosteroidi, che potrebbero anche essere dannosi.
- Trattare vomito/ridotto appetito/nausea con gli inibitori di pompa protonica (come l'omeprazolo) e antiemetici (maropitant o ondansetron).
- Somministrare fluidi di mantenimento per via parenterale, nei volumi necessari per mantenere il paziente idratato e se necessario.
- Nel caso in cui l'SDMA sia aumentata a > 45 µg/dl in Stadio 3, considerare il trattamento suggerito per pazienti in stadio 4.

I farmaci a escrezione prevalentemente renale devono essere utilizzati con cautela e potrebbe essere necessario modificarne il dosaggio per evitare che vengano accumulati.

### **STADIO 4**

Molti pazienti in Stadio 4 IRIS presentano segni clinici sistemici. Nonostante rimanga sempre importante ridurre la progressione della CKD, il trattamento di questi pazienti è focalizzato soprattutto a migliorarne la qualità di vita, in particolare, gestendo la disidratazione, l'acidosi, il vomito, la nausea e l'anemia.

### **Valutare i punti 1, 2, 3, 4, 5 ripostati in Stadio 2**

**Gestire la disidratazione: vedi (a)**

**Ipertensione sistemica: vedi (b)**

**Proteinuria: vedi (c)**

**Ridurre l'assunzione di fosforo con la dieta: vedi (d)**

**Acidosi metabolica: vedi (e)**

### **Indicazioni aggiuntive 1, 2, 3 riportate per il paziente in stadio 3, inoltre:**

- intensificare gli sforzi finalizzati a prevenire la malnutrizione, considerare l'inserimento di un sondino per l'alimentazione (gastrico, esofagostomico).

- Intensificare gli sforzi finalizzati a prevenire la disidratazione. Il sondino esofageo, può essere utilizzato per fornire liquidi oltre che l'alimento.
- Considerare la terapia renale sostitutiva (dialisi e/o il trapianto renale).

I farmaci a escrezione prevalentemente renale devono essere utilizzati con cautela e potrebbe essere necessario modificarne il dosaggio per evitare che vengano accumulati.

## Appendici

### Quando prendere in considerazione la biopsia

1. Nefromegalia.
2. Pazienti giovani con CKD.
3. Proteinuria persistente (PU/CU > 2) in pazienti non iperazotemici.
4. Peggioramento della proteinuria in pazienti CKD.
5. Danno renale acuto, nel momento in cui la biopsia renale può dare indicazioni sulla prognosi.

## Note

Per assicurare la richiesta giornaliera di fluidi ed elettroliti, la fluidoterapia di mantenimento dovrebbe contenere poco sodio (30-40 mmol/l) e idealmente contenere un'integrazione di potassio (circa 13 mmol).

## RACCOMANDAZIONI IRIS PER IL TRATTAMENTO DEI PAZIENTI CKD FELINI

### STADIO 1

1. Sospendere tutti i farmaci potenzialmente nefrotossici (sempre se possibile).
2. Identificare e trattare qualsiasi causa di danno pre-renale (ipoperfusione renale, ipotensione, disidratazione) o post-renale (ostruzione del tratto urinario).
3. Ricercare l'eziologia del danno renale ed escludere qualsiasi condizione trattabile, come es.: pielonefriti (ogni infezione del tratto urinario in un animale con CKD dovrebbe essere considerata come una potenziale pielonefrite e adeguatamente trattata), nefrolitiasi/ureterolitiasi (radiografia e/o ecografia).
4. Misurare la pressione arteriosa e il rapporto proteine totali urinarie/ creatinina urinaria (UPC o PU/ CU).

#### **Gestire la disidratazione: (a)**

In questi pazienti, la capacità di concentrare le urine può essere alterata e quindi bisogna:

- correggere disidratazione clinica, ipovolemia, ipotensione con la fluidoterapia, se necessaria EV o SC.
- Garantire acqua fresca sempre disponibile e favorire il consumo di acqua.

#### **Ipertensione arteriosa: (b)**

Il valore pressorio al di sopra del quale si può presentare un danno d'organo ipertensivo non è noto, ma la probabilità di danno d'organo è proporzionale alla gravità dell'ipertensione.

L'obiettivo è quello di ridurre la SAP < 160 mm Hg per ridurre il rischio di danno agli organi target (sistema nervoso centrale, occhio, cuore). In pazienti, considerati a rischio per lo sviluppo di danno d'organo, con valori pressori > 160 mmHg in modo persistente, può o deve essere già preso in considerazione il trattamento anche in assenza di danno d'organo.

(N.B. Segui le indicazioni riportate nella stadiazione della CKD per decidere le tempistiche di monitoraggio pressorio).

Non è necessario dimostrare un aumento persistente della SAP per decidere se trattare o meno l'animale, se e quando sono presenti segni di danno ipertensivo agli organi target.

Ridurre la SAP è un obiettivo a lungo termine che deve essere raggiunto lentamente e in modo duraturo evitando bruschi decrementi che potrebbero esitare in fenomeni ipotensivi (ricordare che i reni di un paziente con CKD sono soggetti a danno ipotensivo a valori inferiori rispetto a quelli di un paziente sano).

### **Gestire l'ipertensione:**

1. ridurre il consumo di sodio con la dieta; negli animali non esistono evidenze scientifiche che supportino che la riduzione del sodio assunto riduca la pressione; la riduzione del consumo di sodio dovrebbe essere raggiunta lentamente, in associazione alla terapia farmacologica.
2. Utilizzo di calcio antagonisti (CCB), come ad esempio l'amlodipina (0.125 -0.25 mg/kg SID).
3. Raddoppiare il dosaggio di amlodipina (0.25-0.5 mg/kg SID).
4. Combinare al calcio antagonista l'azione di un inibitore del sistema renina-angiotensina-aldosterone (RAAS), es: inibitori dell'enzima di conversione dell'angiotensina [es.: benazepril] o bloccanti dei recettori per l'angiotensina [es.: telmisartan].

Fare attenzione a non introdurre calcio-antagonisti/inibitori del RAAS in pazienti disidratati in quanto la funzione renale (pressione di filtrazione glomerulare) potrebbe ridursi in modo improvviso, se il paziente non è adeguatamente idratato. Tali effetti collaterali sono maggiormente possibili/frequenti nel paziente con CKD rispetto all'animale sano.

### **Monitoraggio del trattamento anti-ipertensivo:**

I gatti ipertesi richiedono trattamenti a vita e la terapia spesso necessita di modificazioni. Il monitoraggio seriale è fondamentale. Dopo aver raggiunto la "stabilizzazione" del valore pressorio, il monitoraggio dovrebbe avvenire al massimo ogni 3 mesi.



SAP < 120 mm Hg e/o sono presenti debolezza o tachicardia è possibile uno stato ipotensivo, che dovrebbe essere evitato !

Con la riduzione della SAP può verificarsi un incremento nella concentrazione della creatinina sierica (aumento di 0.5 mg/dl); incrementi maggiori possono suggerire effetti collaterali legati al farmaco. Un aumento progressivo del valore di creatinina può invece indicare una progressione della malattia o del danno renale.

### **Proteinuria: (c)**

In presenza di gatti in Stadio 1 IRIS con PU/CU > 0.4, dovrebbero essere ricercate le potenziali cause che possano determinare proteinuria (vedi punto 1 e 2 sotto), che dovrebbero essere trattate con adeguate misure anti-proteinuriche (vedi punti 3, 4 sotto).

Gatti con proteinuria borderline (PU/CU compreso tra 0.2 e 0.4) dovrebbero essere strettamente monitorati vedi punti 1 e 4.

1. Ricercare tutte le potenziali cause associate a proteinuria che possano essere trattate.
2. Considerare eventualmente la biopsia renale, come mezzo per identificare patologie sottostanti.
3. Impostare una dieta renale e somministrare inibitori del RAAS (ACEI o ARB)
1. Monitorare la risposta al trattamento e la progressione della patologia:
  - concentrazione creatinina stabile e riduzione di PU/CU = Buona risposta.
  - aumento della creatinina sierica e/o aumento di PU/CU = Progressione della patologia.

Le terapie impostate possono essere mantenute per tutta la vita, a meno che la patologia sottostante non sia in risoluzione, in questo caso può essere considerata una riduzione della dose tenendo monitorato il PU/CU.

### **Note:**

- l'uso degli inibitori del RAAS è controindicato in tutti gli animali disidratati o ipovolemici. Correggere la disidratazione prima di usare questo tipo di farmaco !

- Gatti proteinurici e ipoalbuminemici presentano lo stesso rischio di tromboembolismo del cane; es.: l'aspirina risulta però di più difficile impiego per raggiungere un effetto selettivo antiaggregante; la dose consigliata in gatti con albumine sieriche < 2 g/dl è 1 mg/kg ogni 72h (è possibile valutare l'utilizzo di clopidogrel).
- Gatti con fosforo sierico all'interno degli intervalli di riferimento suggeriti da IRIS presentano un maggior rischio di sviluppare ipercalcemia nel momento in cui viene introdotta la dieta renale. Monitorare il calcio sierico, se il calcio totale dovesse superare i 12 mg/dl modificare la dieta con un alimento adatto per soggetti anziani o far mescolare la dieta con alimento standard in ugual proporzione (50:50).
- Nel caso in cui la proteinuria permanga borderline in modo persistente, può essere iniziato comunque il trattamento antiproteinurico. Non esiste, tuttavia, una chiara evidenza scientifica che la terapia anti-proteinurica riduca la progressione della malattia renale cronica.

## **STADIO 2**

**Considerare i punti 1, 2, 3, 4 riportati nello Stadio1.**

**5 Introdurre la dieta renale:** dovrebbe essere più semplice far accettare la dieta al paziente nei primi stadi di CKD, poiché l'animale solitamente è ancora appetente

**Gestire la disidratazione: vedi (a)**

**Ipertensione sistemica: vedi (b)**

**Proteinuria: vedi (c)**

In presenza di gatti in Stadio 2 IRIS con UPC > 0.4, dovrebbero essere ricercate le potenziali cause che possano determinare proteinuria (vedi punto 1 e 2 riportati in Stadio 1), e dovrebbero essere trattate con adeguate misure anti-proteinuriche (vedi punti 3, 4 riportati in Stadio 1).

**Vedi tutti i punti e le note riportati per lo Stadio1.**

**Ridurre l'assunzione di fosforo con la dieta (d)**



Molti gatti in Stadio 2 presentano una concentrazione di fosforo sierica nella norma, ma presentano una concentrazione di paratormone aumentata. L'evidenza scientifica suggerisce di ridurre la quantità di fosforo con la dieta mantenendo una concentrazione di fosforo sierica  $\leq 4.5$  mg/dl, ma maggiore di 2.7 mg/dl.

Al fine di raggiungere questo obiettivo:

1. restrizione dietetica di fosforo (dieta renale).
2. Se la concentrazione sierica di fosforo rimane di  $> 4.5$  mg/dl nonostante la restrizione dietetica, somministrare dei chelanti del fosforo (es idrossido di alluminio, calcio carbonato, calcio acetato, lantanio carbonato) ad effetto, iniziare con un dosaggio di 30-60 mg/kg/giorno diviso per il numero di pasti (mescolandolo con l'alimento).

La dose necessaria può variare in base alla quantità di fosforo assunta con la dieta e lo stadio CKD.

Monitorare la concentrazione di calcio sierico e fosforo ogni 4-6 settimane, fino a che non sia stabile, poi ogni 12 settimane.

La presenza di debolezza muscolare generalizzata e microcitosi, possono essere effetti secondari alla tossicità da alluminio, nel caso in cui si utilizzi un chelante contenente alluminio.

L'ipercalcemia dovrebbe essere evitata, talvolta è necessario combinare al calcio carbonato l'idrossido di alluminio.

### **Acidosi metabolica (e)**

Se il paziente presenta acidosi metabolica una volta introdotta la dieta renale, somministrare bicarbonato di sodio (o citrato di potassio se ipokaliemico) ad effetto, per mantenere i bicarbonati o CO<sub>2</sub> totale tra 16-24 mmol/l.

### **Indicazioni aggiuntive per il paziente in stadio 2:**

Se il paziente è ipokaliemico, il potassio gluconato o il potassio citrato possono essere somministrati ad effetto (tipicamente 1-2 mmol/kg/die).

Se l'SDMA è aumentata  $> 25\mu\text{g/dl}$ , considerare l'eventualità di trattare il paziente come uno Stadio 3.

## **STADIO 3**

I gatti in Stadio 3 possono avere una presentazione clinica variabile, dall'assenza di segni clinici a segni clinici evidenti. Il trattamento descritto per gli Stadi 1 e 2 è valido nei gatti in stadio 3 asintomatici, mentre per quelli in stadio 3 avanzato diventa importante migliorare la qualità di vita, gestendo la disidratazione, la nausea, il vomito, l'anemia e l'acidosi metabolica.

**Considerare i punti 1, 2, 3, 4, 5 ripostati nello Stadio 2.**

**Gestire la disidratazione: vedi (a)**

**Ipertensione sistemica: vedi (b)**

**Proteinuria: vedi (c)**

In presenza di gatti in Stadio 3 con UPC > 0.4, dovrebbero essere ricercate le potenziali cause che possono determinare proteinuria (vedi punto 1 e 2 Stadio 1), che dovrebbero essere trattate con adeguate misure anti-proteinuriche (vedi punti 3, 4 Stadio 1).

Vedi tutti i **punti** e le note riportati per lo **Stadio 2**.

**Ridurre l'assunzione di fosforo con la dieta (d)**

Vedi punti 1 e 2 ripostati in Stadio 2

L'evidenza scientifica supporta un uso giudizioso del calcitriolo come fattore in grado di prolungare la sopravvivenza in cani in Stadio 3; il ruolo benefico di basse dosi di calcitriolo nel gatto non è ancora stato ben chiarito.

**Acidosi metabolica: vedi (e)**

**Indicazioni aggiuntive per il paziente in Stadio 3:**

Se il paziente è ipokaliemico, il potassio gluconato o il potassio citrato possono essere somministrati ad effetto (tipicamente 1-2 mmol/kg/die).

Trattare vomito/calore di appetito/nausea e perdita di peso con antiemetici, stimolanti dell'appetito, farmaci anti-nausea (es: maropitant, ondansetron, mirtazapina). L'evidenza suggerisce che la mirtazapina (1.88 mg/gatto ogni 48h per 3 giorni) è in



grado di ridurre il vomito, di aumentare l'appetito ed evita la perdita di peso.

Il Maropitant (1mg/kg/giorno per 2 settimane) riduce il vomito, ma non impatta sull'acquisizione del peso e sull'appetito.

Ulteriori indagini sono necessarie per decidere se questi altri farmaci siano davvero utili nella gestione delle problematiche gastrointestinali in pazienti CKD, soprattutto quando somministrati nel lungo periodo.

Somministrare fluidi di mantenimento per via parenterale, nei volumi necessari per mantenere il paziente idratato (NdC. solo quando è realmente necessario).

Se l'SDMA è aumentata a  $> 45\mu\text{g/dl}$ , considerare l'eventualità di trattarlo come un paziente in stadio 4.

I farmaci ad escrezione prevalentemente renale devono essere utilizzati con cautela e potrebbe essere necessario modificarne il dosaggio per evitare che vengano accumulati.

## **STADIO 4**

Molti pazienti in Stadio 4 presentano segni clinici extra-renali. Nonostante rimanga sempre importante ridurre la progressione della CKD, il trattamento è focalizzato a migliorare la qualità di vita, in particolare, gestendo la disidratazione, l'acidosi, il vomito, la nausea e l'anemia.

### **Considerare i punti 1, 2, 3, 4, 5 ripostati nello Stadio 2**

**Gestire la disidratazione: vedi (a)**

**Ipertensione sistemica: vedi (b)**

**Proteinuria: vedi (c)**

In presenza di gatti in Stadio 4 con  $\text{UPC} > 0.4$ , dovrebbero essere ricercate le potenziali cause che possano determinare proteinuria (vedi punto 1 e 2 riportati in Stadio 1), e dovrebbero essere adeguatamente trattate con misure anti-proteinuriche (vedi punti 3, 4 riportati in Stadio 1).

**Vedi i punti e le note riportati per lo Stadio 1.**

**Ridurre l'assunzione di fosforo con la dieta: vedi (d) e vedi punti 1, 2, 3 Stadio 3.**

**Acidosi metabolica: vedi (e)**

#### **Indicazioni aggiuntive per il paziente in Stadio 4:**

1. se il paziente è ipokaliemico, il potassio gluconato o il potassio citrato possono essere somministrati ad effetto (tipicamente 1-2 mmol/kg/die).
2. Considerare di trattare l'anemia, nel caso in cui impatti sulla qualità di vita del paziente, tipicamente questo accade quando il PCV è < 20% (NdC. 15% nel gatto); l'eritropoietina ricombinante umana è il trattamento efficace, ma non è approvata per l'utilizzo in veterinaria; viene consigliato l'utilizzo di darbepoetina, perché meno antigenica dell'epoetina alfa; non è provato l'effetto positivo dei corticosteroidi, che potrebbero anche essere dannosi.
3. Trattare vomito/calore di appetito/nausea e perdita di peso con antiemetici, stimolanti dell'appetito, farmaci antinausea (es: maropitant, ondansetron, mirtazapina). L'evidenza suggerisce che la mirtazapina (1.88 mg/gatto ogni 48h per 3 giorni) sia in grado di ridurre il vomito, di aumentare l'appetito e evitare la perdita di peso. Maropitant (1mg/kg/giorno per 2 settimane) riduce il vomito ma non impatta sull'acquisizione del peso e sull'appetito. Ulteriori indagini sono necessarie per decidere se questi farmaci siano davvero utili nella gestione delle problematiche gastrointestinali in pazienti CKD, soprattutto se somministrati nel lungo periodo.
4. Somministrare fluidoterapia di mantenimento per via parenterale, nei volumi necessari per mantenere il paziente idratato (vedi note) (NdC. solo quando realmente necessario).
5. Intensificare gli sforzi finalizzati a prevenire la malnutrizione, considerare l'inserimento di un sondino per l'alimentazione (gastrico, esofagostomico).
6. Intensificare gli sforzi finalizzati a prevenire la disidratazione; il sondino esofagostomico può essere utilizzato per fornire liquidi oltre che l'alimento.
7. Considerare la terapia renale sostitutiva (dialisi e/o trapianto renale).

I farmaci ad escrezione prevalentemente renale devono essere utilizzati con cautela e potrebbe essere necessario modificarne il dosaggio per evitare che vengano accumulati.

## Appendici

Quando prendere in considerazione la biopsia:

- nefromegalia.
- Pazienti giovani con CKD.
- Proteinuria persistente (es.: UPC > 2) in pazienti non iperazotemici.
- Peggioramento della proteinuria in pazienti CKD.
- Danno renale acuto, nel momento in cui la biopsia renale può dare indicazioni sulla prognosi.

## Note

Per assicurare la richiesta giornaliera di fluidi ed elettroliti, la fluidoterapia di mantenimento dovrebbe contenere poco sodio (30-40 mmol/l) e idealmente contenere un'integrazione di potassio (circa 13 mmol).

## PERCHÈ DOBBIAMO SEMPRE ESEGUIRE DUE PROIEZIONI DEL TORACE E DELL'ADDOME PER AVERE UNO STUDIO RADIOGRAFICO DIAGNOSTICO?

di Dr.ssa Giliola Spattini

La radiologia è la modalità di diagnostica per immagini più a disposizione e più utilizzata in medicina veterinaria. Tuttavia non è la più semplice, sia per l'esecuzione, sia per l'interpretazione. A volte si tende ad effettuare un'unica proiezione toracica e addominale incorrendo, così, in cattive interpretazioni diagnostiche.

Questo breve post cerca di spiegare perché questo è sbagliato e perché ciò può generare disastri!!! Il mio consiglio è quello di prospettare al nostro cliente, proprietario di animale, un costo per lo "studio radiografico" e non per singola esposizione, e spiegare chiaramente il motivo per cui sarà necessario effettuare più proiezioni radiografiche. Sarà più costoso eseguire uno studio radiografico, ma i risultati diagnostici saranno abissalmente diversi.

Detto ciò passiamo al lato pratico. Vi chiedo di analizzare ed emettere le diagnosi differenziali per la radiografia toracica che segue. Se vi è capitato di cercare di interpretare uno studio radiografico in singola proiezione, prego, divertitevi con questo caso. Come anamnesi posso dirvi che è un controllo per una patologia cronica.

**Alla semplice domanda (che in realtà semplice non è !): questo è un torace normale? Che cosa rispondereste?**

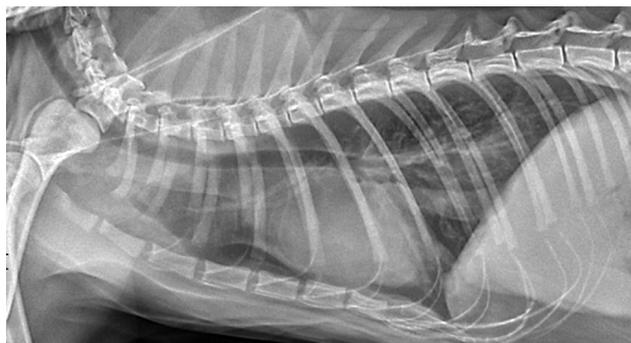


Immagine 1 – Esame radiografico di torace di gatto proiezione laterale.

Pensate che il torace non sia normale, che cosa c'è di anomalo? Difficile?

Certo, praticamente impossibile interpretare questa radiografia. Infatti si deve ricordare che quando il paziente viene posizionato in decubito laterale, il polmone declive tende a collapsare per la forza di

gravità per cui contenendo molta meno aria, perde il normale contrasto e in pratica non si vede. Per cui in una proiezione laterale si identificano in genere dal 40 al 50% circa delle strutture toraciche che sarebbero normalmente identificabili con almeno due proiezioni. E non solo.

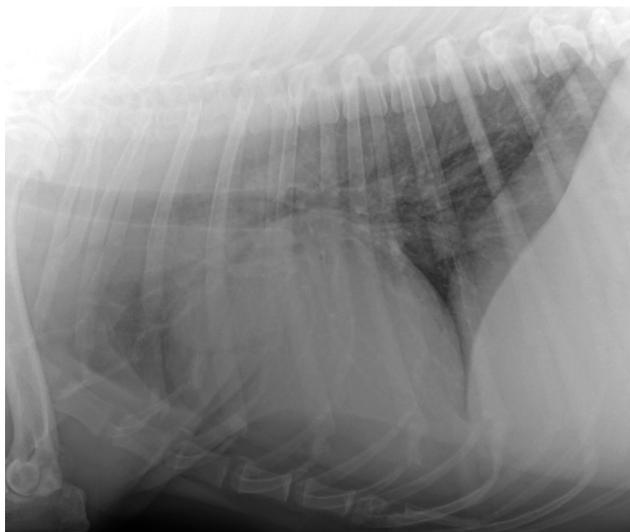
Se aggiungo la proiezione sagittale, appare evidente che questo paziente ha solo i lobi polmonari destri, in quanto i sinistri sono stati asportati chirurgicamente a causa di una gravissima patologia pleurica che purtroppo risultò essere un mesotelioma.



*Immagine 2 – Gatto esame radiografico del torace proiezione sagittale.*

Avreste immaginato una simile situazione dalla laterale?

**Non convinti? Ok, altro esempio.**



*Immagine 3 – Cane labrador, radiografia torace LLDX.*

Per questo motivo la curva diaframmatica destra è dislocata cranialmente e i polmoni che risultano poveri di aria, risultano molto radio-opachi.

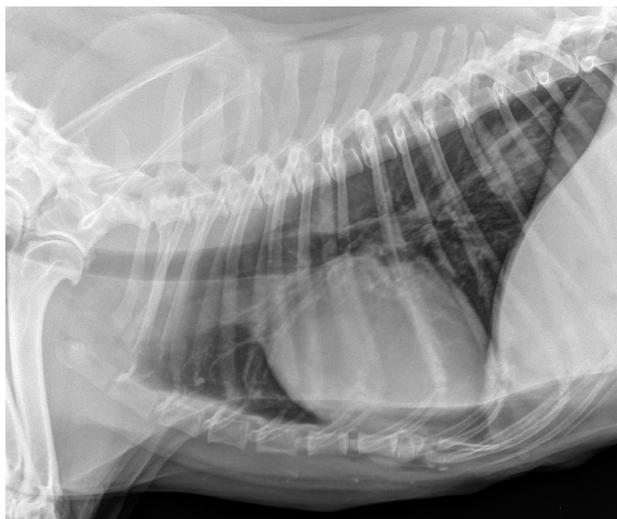
### **Per quale motivo Sugar tossisce?**

Passato un mese la paziente continua a tossire ed ha perso quasi sette chili nonostante l'appetito sia quasi conservato. Che fare?

Si ripete l'esame radiografico, questa volta con la paziente non sedata.

Vi allego l'immagine del torace di una meticcia Labrador di 9 anni che tossisce (Immagine 3).

È stata eseguita solo una proiezione, con la paziente sedata. Sarebbe un decubito laterale destro, ma in realtà è un decubito sinistro, solo che a causa della sedazione e del fatto che la paziente è rimasta per 20 minuti sdraiata sul lato destro, i lobi destri sono completamente atelettasici.



*Immagine 4 – Cane Labrador, radiografia torace LLSN dopo 30 giorni.*

## Come? Non credete che sia la stessa paziente?

Controllate l'artrosi nelle spalle e nei gomiti e controllate le alterazioni delle giunzioni costo-condrali e l'ottava sternebra: non ci possono essere dubbi che sia la stessa paziente. L'aver perso 7 kg cambia completamente la radiopacità del polmone e anche il fatto che ora il polmone è completamente areato aiuta molto.

Notate niente? Forse un mal definito aumento di pattern interstiziale a livello dei campi dorso-caudali? Che cosa faresti adesso? Che ne dite delle altre due proiezioni?



*Immagine 5 – Cane Labrador, radiografia to-race LLDX dopo 30 giorni.*



*Immagine 6 – Cane Labrador, radiografia to-race DV dopo 30 giorni.*

## Ci sono dei dubbi ora sul perché questa paziente tossisce?

Avremmo potuto diagnosticare facilmente il problema della paziente un mese fa se solo avessimo fatto almeno un'altra proiezione (sempre la sagittale).

## NUOVI TEST ALLERGOLOGICI (NOVITÀ 2019)

di Francesco Albanese



*Immagine 1 – Dermatite atopica.*

### **Nuova possibilità nella definizione degli allergeni in caso di Dermatite atopica del cane e del gatto.**

La **dermatite atopica** (DA) è una malattia dermatologica cronica pruriginosa, su base ereditaria, che colpisce numerose specie animali tra cui cane, gatto e cavallo. Le lesioni cliniche sono variabili secondo la specie interessata e hanno come comune denominatore il sintomo prurito.

La DA è innanzitutto una **diagnosi clinica**, che si formula dopo l'esclusione di tutte le altre malattie che possono manifestarsi con sintomatologia pruriginosa: dermatiti da ectoparassiti quali la rogna sarcoptica e infestazioni/allergia alla saliva della pulce e, soprattutto, vista la similitudine clinica con la DA, le reazioni avverse al cibo (intolleranza/allergia).



Una volta ottenuta la diagnosi clinica, le possibilità terapeutiche prevedono una terapia farmacologica o un'immunoterapia allergene-specifica ("vaccino"). La scelta degli allergeni da inserire nel "vaccino" si basa sul risultato dei test allergometrici.

### **Quali sono i test allergometrici proposti dal nostro laboratorio?**

Da anni il test proposto dal nostro laboratorio per la ricerca delle IgE allergene-specifiche è il test Elisa (macELISA) prodotto dai laboratori Greer (monoclonal antibody cocktail-based enzyme-linked immunoassorbent assay). E' un test composto da un cocktail di anticorpi monoclonali.

Il test ha un'elevata specificità e sensibilità, tant'è che è utilizzato dalla maggior parte dei laboratori. In un recente studio comparativo effettuato in 10 laboratori europei e americani, tale test ha dimostrato una concordanza dei risultati che supera il 95%.

Tale concordanza era riferita non solo agli esami eseguiti sullo stesso campione da parte di diversi operatori che lavorano nello stesso laboratorio, ma anche sullo stesso campione lavorato in laboratori diversi. Tale risultato testimonia come il test macELISA della Greer sia un affidabile e concordante tra i vari laboratori.

### **Qual è la novità del 2019?**

Nel listino 2019 è stato inserito un test allergometrico che sfrutta una metodica diversa.

Tale test non è in realtà nuovo, essendo già commercializzato da diversi anni. Il test, **ALLERCEPT TM Definitive Allergen Panels**, è sempre un test ELISA, che ricerca un dominio biotinilato ricombinante extracellulare, in natura presente sul mastocita, che ha un'alta affinità per la proteina recettore Fc-epsilon della catena alfa dell'anticorpo allergene-specifico.

In uno studio che comparava i risultati di questo test con il macELISA, è stata evidenziata una concordanza media tra i due test di circa il 92%.

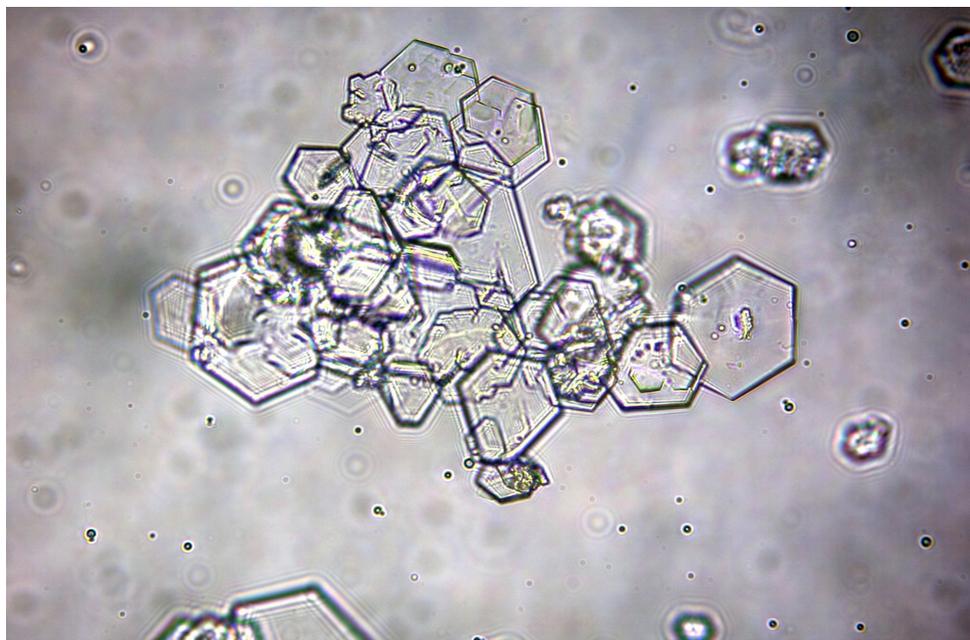
In base alle vostre specifiche preferenze potrete quindi scegliere tra i due metodi ora disponibili in listino.

### **Bibliografia:**

Lee KW, Blankenship KD, McCurry ZM, et al Performance characteristics of a monoclonal antibody cocktail-based ELISA for detection of allergen-specific IgE in dogs and comparison with a high affinity IgE receptor-based ELISA. Vet Dermatol. 2009 Jun;20(3):157-64. doi: 10.1111/j.1365-3164.2009.00740.x. Epub 2009 Apr 3.

## LA CISTINURIA NEL GATTO

di Francesco Dondi e Walter Bertazzolo



*Immagine 1 – Cristalli di cistina in urine di gatto.*

Vi riportiamo un aggiornamento relativo alla problematica della cistinuria nel gatto (anche se molte di queste informazioni sono traslabili anche al cane, in cui è sicuramente più frequente).

**Introduzione e patogenesi:** la cistinuria è un problema considerato estremamente raro nel gatto. La cistinuria in realtà deve essere inquadrata in un disturbo tubulare renale molto più complesso. In questi pazienti infatti, i tubuli renali sono spesso disfunzionali e non sono in grado di riassorbire numerosi amminoacidi (amminoaciduria). In casi più rari sono presenti disfunzioni tubulari più complesse, ma spesso asintomatiche. Tra gli amminoacidi che vengono persi nel lume tubula-



re, la cistina rappresenta quello meno solubile e di conseguenza, se sono presenti alcune condizioni (pH urinario acido, urine molto concentrate), può precipitare a formare i caratteristici cristalli e conseguentemente a formare calcoli.

Bisogna considerare, tuttavia, che i pazienti che vediamo con urolitiasi da cistina o cristalluria di cistina, rappresentano solo la punta di un iceberg, poiché in molti casi l'escrezione di questo amminoacido è sì patologica, ma non conduce a nessun rilievo clinico o clinico-patologico rilevabile.

Si pensa che il problema nel gatto sia legato ad un difetto genetico non ancora chiaramente identificato, mentre nel cane sono presenti numerosi studi in merito che hanno identificato un numero sempre crescente di razze potenzialmente predisposte o che più frequentemente presentano il problema genetico. Nel gatto, uno studio che riporta 11 casi di cistinuria ha ritrovato il problema prevalentemente in gatti siamesi (6/11), comune europeo (3/11) e altre razze (2/11). A differenza del cane, in cui il problema è nella quasi totalità dei casi ritrovabile nel maschio (98% dei casi), nel gatto la maggioranza dei pazienti è invece di sesso femminile (9/11 femmine nello studio precedente, di cui 7 sterilizzate).

In maggiore dettaglio, la cisteina deriva dal metabolismo della metionina che viene trasformata in cisteina; la cisteina è fortemente solubile, ma viene ossidata a cistina prima dell'escrezione renale. L'amminoacido, quindi, è eliminato quasi totalmente sotto forma di cistina che risulta decisamente poco solubile nell'ambiente urinario (questo concetto deve essere ricordato per comprendere poi l'approccio terapeutico; grazie all'uso di alcuni farmaci, infatti, questo processo può essere convertito per portare alla formazione di cisteina da cistina riducendo o evitando la cristallizzazione). Come citato in precedenza, inoltre, la solubilità si riduce ulteriormente quando siamo in presenza di un pH urinario acido, urine molto concentrate ed eccessiva concentrazione di cistina.

**Epidemiologia:** nel gatto, la frequenza di urolitiasi di cistina, dai pochi dati presenti in letteratura, è quantificabile allo 0,3-0,6% di tutti i calcoli ritrovati nel gatto. Morfologicamente, quando presenti, i calcoli si presentano di solito rotondeggianti, di colore giallastro e con superficie liscia o leggermente rugosa (ricordiamo che non è possibile l'identificazione dei calcoli dalla sola analisi morfologica!).

I gatti di solito presentano piccoli uroliti a localizzazione quasi esclusivamente vescicale e che possono poi dislocarsi a livello uretrale (nel cane gli uroliti di cistina

possono localizzarsi anche a livello renale con dislocazione ureterale, e, siccome colpiscono quasi esclusivamente i maschi, sono di solito causa di ostruzione uretrale dopo dislocazione dalla vescica).

**Diagnosi:** come citato sopra il gatto può presentare o meno segni clinici riferibili all'urolitiasi o i calcoli possono essere evidenziati con diagnostica per immagini (ecografia addominale). La radio-opacità dei calcoli di cistina è considerata moderata-scarso, ovvero questi calcoli possono non essere radiologicamente visibili.

L'esame urine mette in evidenza di solito:

- PS elevato (> 1035-1040).
- PH acido (< 6.5).
- Cristalluria di cistina (patognomonica; attenzione perché l'assenza di cristalluria non consente di escludere la cistinuria).
- Eventuale presenza di sedimento infiammatorio.
- Eventuali segni di infiammazione del tratto urinario (frequente complicazione soprattutto nel cane).
- Possibile quantificazione della cistinuria tramite metodiche specifiche di chimica urinaria (scarsamente disponibile).

La funzionalità renale di questi animali è normale, nonostante il difetto tubulare, salvo quando non siano presenti segni di danno renale acuto post-renale (ostruzione del tratto urinario).

La diagnosi definitiva si ottiene con l'analisi del calcolo (idealmente analisi quantitativa con spettroscopia infrarossa) o con la visualizzazione dei caratteristici cristalli all'esame del sedimento urinario (meglio se in combinazione).

**Trattamento e prevenzione:** non esiste un trattamento eziologico specifico per la cistinuria, ma la terapia è mirata a ridurre l'escrezione di cistina e ad aumentarne la solubilità. Tale trattamento dovrà essere continuato per tutta la vita del paziente. Il clinico deve ricordare che gli uroliti di cistina possono essere dissolti con terapia medica.



La terapia prevede:

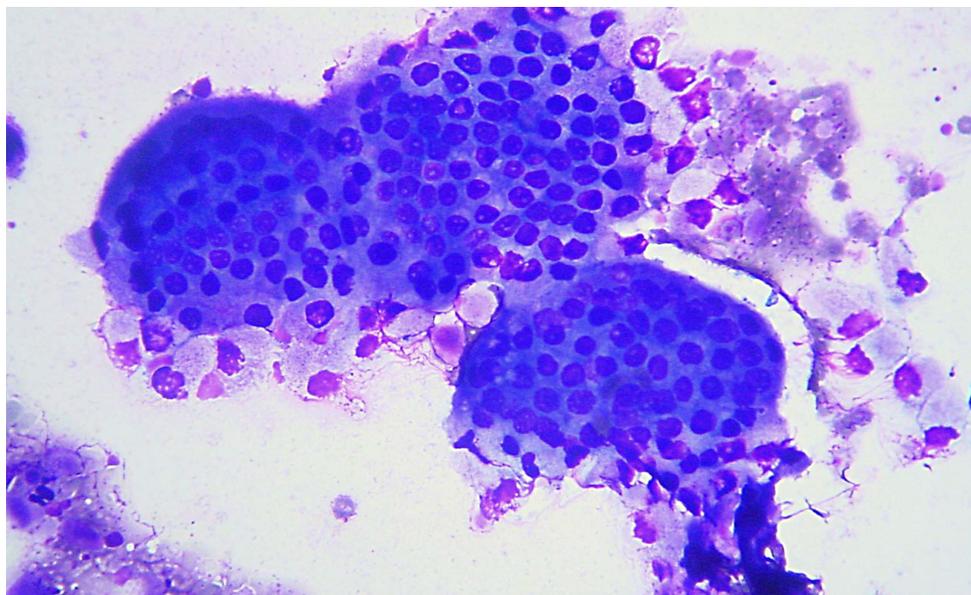
- aumento della diuresi.
- Utilizzo di una dieta con restrizione proteica e a basso contenuto di metionina e di sodio.
- Alcalinizzazione urinaria (tramite dieta e/o farmaci/integratori; es.: Citrato di potassio) per aumentare la solubilizzazione della cistina.
- Utilizzo di farmaci (es.: Tiopronina o D-penicillamina) in grado di aumentare la solubilità della cistina o favorire una maggiore escrezione di cisteina (maggiormente solubile) (es.: Acido ascorbico).
- Controllo delle infezioni del tratto urinario.
- Castrazione (indicata nel cane in cui la malattia è presente quasi esclusivamente in soggetti di sesso maschile).

Tramite questa terapia i target da raggiungere sono i seguenti:

- PS urinario < 1025-1030 (gatto); < 1020 cane.
- PH urinario  $\geq 7,5$ .
- Assenza di cristalluria di cistina o di altre tipologie (es.: struvite).
- Assenza di sedimento attivo/infezione del tratto urinario (necessario esame batteriologico).
- Scomparsa/riduzione dimensioni dei calcoli di cistina.
- Riduzione della concentrazione di urea sierica (come indicatore dell'uso di una dieta ipoproteica associata ad induzione della diuresi).

## PERCHÈ MISURARE L'ESTERASI PROSTATICA SPECIFICA CANINA?

di Maria Carmela Pisu



*Immagine 1 – Quadro citologico riferibile ad iperplasia prostatica.*

L'iperplasia prostatica benigna è una alterazione comune nei cani maschi interi adulti/anziani che può condurre a disturbi clinici altrettanto comuni (disuria, ematuria, dischezia, ecc.).

La diagnosi di questa condizione è storicamente basata sui rilievi clinici, ecografici e sulla citologia ago-aspirativa (a fianco un esempio di iperplasia prostatica all'esame citologico).

Negli ultimi anni è stata evidenziata la possibilità di valutare le modificazioni prostatiche attraverso l'aumento sierico di una esterasi specifica prostatica canina (Canine Prostatic Specific Esterase, CPSE).

È stato quindi recentemente sviluppato un nuovo mezzo diagnostico: un test ELISA per valutare la CPSE.



L'esterasi specifica viene prodotta e rilasciata nel circolo ematico dalle cellule prostatiche e il suo aumento è indice di iperattività e quindi iperplasia ghiandolare (ma anche di altre alterazioni con aumento della densità cellulare).

In studi recenti (Levy et al., Alonge et al.) la diagnosi di iperplasia prostatica benigna (IPB) è stata effettuata tramite ecografia e i risultati comparati alla concentrazione sierica di CPSE. Le concentrazioni di CPSE erano significativamente superiori nei cani con IPB che in quelli senza evidenza ecografica di IPB.

La soglia ottimale del valore di CPSE che consente di discriminare tra cani sani e cani con IPB è risultata inizialmente di 70 mg/ml ed è stata recentemente abbassata a 50 ng/ml per includere i soggetti che hanno iniziali alterazioni ecografiche ma senza ancora alcun segno clinico.

Il dosaggio sierico di CPSE non può ad oggi sostituire lo studio ecografico della prostata per evidenziare le alterazioni sintomatiche, ma risulta un validissimo e rapido test di screening da effettuare sui cani oltre i 5 anni di età (4 anni per cani di razza gigante e riproduttori), al fine di evidenziare una iniziale o avanzata iperplasia prostatica e di valutare la necessità di indagini più approfondite e/o terapie in tempi precoci o precocissimi.

Poiché numerosi studi dimostrano che nell'80% dei soggetti l'IPB ha la sua iniziale insorgenza in un'età inferiore al 50% dell'aspettativa media di vita di un cane, l'utilizzo di un test ematico da poter inserire tra i test di screening, consente di evitare la comparsa della sintomatologia correlata alla sindrome prostatica e salvaguardare la fertilità nei soggetti destinati alla riproduzione.

Come per gli altri ormoni, anche il CPSE va dosato sul siero.

### **Bibliografia**

X Levy<sup>1</sup>, W Nizansky, A von Heimendahl and P Mimouni. Diagnosis of Common Prostatic Conditions in Dogs: an Update *Reprod Dom Anim* 49 (Suppl. 2), 50–57 (2014);

W Nizanski<sup>1</sup>, X Levy<sup>2</sup>, M Ochota<sup>1</sup> and J Pasikowska. Pharmacological Treatment for Common Prostatic Conditions in Dogs – Benign Prostatic Hyperplasia and Prostatitis: an Update *Reprod Dom Anim* 49 (Suppl. 2), 8–15 (2014);

S. Alonge, M Melandri, R Leoci, GM Lacalandra, G Aiudi. Canine prostate specific esterase (CPSE) as an useful biomarker in preventive screening programme of canine prostate: CPSE threshold value assessment and its correlation with ultrasonographic prostatic abnormalities in asymptomatic dogs *Reprod Dom Anim* Nov 2017;

BS Holst. Diagnostic possibilities from a serum sample—Clinical value of new methods within small animal reproduction, with focus on anti-Müllerian hormone *Reprod Dom Anim* Apr;52 Suppl 2:303-309;

## **COS'È E A COSA PUÒ SERVIRE LA COLINESTERASI SIERICA?**

di Walter Bertazzolo

La colinesterasi misurata nel siero è un enzima più correttamente descritto come “pseudo-colinesterasi” o “butiril-colinesterasi”, per distinguerla dalla colinesterasi presente a livello di placca neuromuscolare, con la quale condivide la medesima capacità enzimatica.



*Immagine 1 – Modello tridimensionale dell'enzima (immagine tratta da wikipedia).*

Viene prodotta a livello epatico, pancreatico ed intestinale.

In medicina veterinaria è conosciuta più che altro per la possibilità di diagnosticare un avvelenamento da esteri fosforici e carbammati, a causa dei quali la sua attività sierica si riduce in maniera molto marcata. Tuttavia ci sono altre condizioni cliniche in cui questo enzima può dare informazioni cliniche utili.

Cause di diminuzione:

- avvelenamenti da carbammati e organo-fosforici: sono tossici in grado di bloccare l'attività enzimatica di colinesterasi e pseudo-colinesterasi.
- Gravi patologie enteriche con malassorbimento (es. Enteropatie proteino-disperdenti): in questo caso è l'epitelio intestinale che produce meno enzima.
- Insufficienza epatica grave: allo stesso modo in corso di gravi epatopatie non cirrotiche con insufficienza, l'enzima vi è una ridotta produzione epatica di enzima (es. Shunt, epatiti fulminanti).



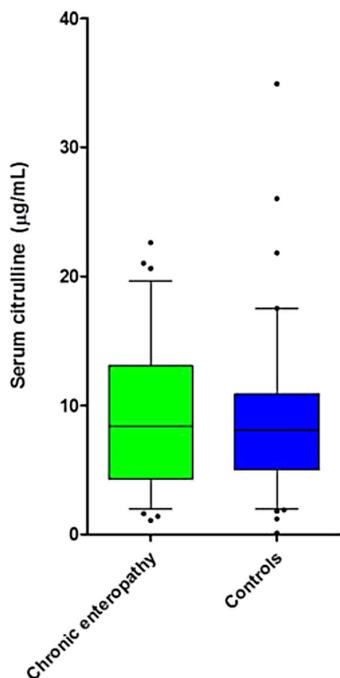
Cause di aumento - Numerose cause possono indurre una iper-produzione o rilascio di colinesterasi:

- vari tipi di epatopatie: lipidosi, cirrosi, epatiti croniche con fibrosi, ecc.
- Trattamenti farmacologici: cortisonici, barbiturici.
- Endocrinopatie: diabete mellito, iperadrenocorticismo e ipotiroidismo.
- Stati iperlipemici.
- Pancretite.
- Neoplasie (es. Linfoma con infiltrazione epatica).

Da nostre personali osservazioni non pubblicate, abbiamo notato come spesso aumenti in corso di linfoma con infiltrazione epatica e in corso di ipertiroidismo felino. In quest'ultima disendocrinia, i livelli di colinesterasi tendono poi a rientrare nei limiti di normalità a seguito del trattamento.

## UTILITÀ (... O INUTILITÀ) DELLA CITRULLINEMIA NELLE ENTEROPATIE CRONICHE CANINE

di Walter Bertazzolo & Magda Gerou-Ferriani



La misurazione della citrullina sierica è stata proposta in passato quale possibile marker di funzione intestinale.

Essendo nell'uomo sintetizzata esclusivamente a livello di enterociti, è stato ipotizzato che la sua concentrazione ematica fosse quindi correlata con la massa enterica funzionante. Nell'uomo numerosi studi sembrano confermare la sua utilità in gastroenterologia.

In veterinaria tuttavia, un solo studio in passato ha confermato questi dati, ma era relativo a un gruppo di cani affetti da gastro-enterite acuta causata da parvovirus.

La nostra consulente in medicina interna Magda Gerou-Ferriani, insieme ad altri autori, ha pubblicato recentemente un interessante studio su *Journal of Veterinary Internal Medicine*, relativo all'utilizzo della citrullina nella valutazione diagnostica e prognostica delle enteropatie croniche canine.

I risultati sono stati molto sorprendenti, e anche scoraggianti: la concentrazione di citrullina sierica non differiva infatti tra i cani con enteropatia cronica e i controlli, e non differiva nemmeno tra le diverse cause di enteropatia.

Inoltre non vi era nessuna differenza correlabile con la gravità della patologia (score CIBDAI), alla presenza o meno di enteropatia proteino-disperdente, e nemmeno con la prognosi delle patologie valutate e la eventuale risposta terapeutica.



In conclusione, sostengono gli autori, non si è potuta rilevare nessuna differenza significativa tra i vari gruppi, rendendo questo analita praticamente inutile nelle forme croniche canine. Probabilmente in queste enteropatie del cane non si assiste ad una drastica riduzione della massa di enterociti come in alcune gravi patologie umane o nella parvovirosi canina.

Per chi volesse leggere l'intero studio, in allegato potete scaricare l'articolo completo Open-Access.

CLICCA [QUI](#) PER L'ARTICOLO

## **QUALE SIGNIFICATO DARE AI MONITORAGGI TERAPEUTICI DEGLI ANTICONVULSIVANTI?**

Io staff di MyLav

Il monitoraggio terapeutico dei cani e dei gatti affetti da epilessia idiopatica e sottoposti a trattamenti con farmaci antiepilettici (es. fenobarbitale e bromuro, quest'ultimo solo nella specie canina) è parte integrante del controllo periodico che questi pazienti devono affrontare.

Il clinico, una volta iniziata la terapia, deve periodicamente verificare la concentrazione ematica di questi principi attivi. Come ben sapete, il laboratorio riporta i range terapeutici che, tuttavia, dovrebbero essere considerati come puramente indicativi. La terapia dovrebbe venir "aggiustata" tenendo conto sia della concentrazione ematica del farmaco utilizzato, che della risposta clinica. Non è possibile decidere se mantenere, ridurre o incrementare il dosaggio di un farmaco sulla base della sola concentrazione ematica. Infatti, questo dato deve essere letto in congiunzione con altri parametri, quali il controllo delle crisi e gli eventuali effetti collaterali presenti.

Facciamo degli esempi pratici: un paziente potrebbe infatti avere un apparente dosaggio insufficiente (concentrazione di principio attivo inferiore ai limiti indicati come riferimento), ma se la sintomatologia è ben controllata, non è necessario aumentare la dose di somministrazione. Al contrario, potrebbe verificarsi una situazione in cui la sintomatologia è ben controllata e la concentrazione di principio attivo appare troppo elevata; in questo caso potrebbe essere invece consigliabile diminuire la dose di somministrazione al fine di ridurre possibili effetti collaterali e/o prevenire una tossicità epatica.

Allo stesso modo, la decisione sull'uso combinato di due farmaci deve essere il frutto di considerazioni che tengano conto delle condizioni cliniche del paziente, del controllo delle crisi e degli effetti collaterali presenti. In questi casi, può essere utile affidarsi all'esperienza di uno specialista.

Per qualsiasi necessità il nostro team di esperti neurologi (dr. Baroni e Gemone, prof. Gandini) può consigliarvi qualora nutriate dei dubbi circa l'efficacia del trattamento in atto.

A titolo esemplificativo, vi allego un algoritmo (vedi immagine allegata sotto) creato dal prof. Gandini per Dechra che fornisce le linee guida per la gestione terapeutica con un fenobarbitale ad uso veterinario.

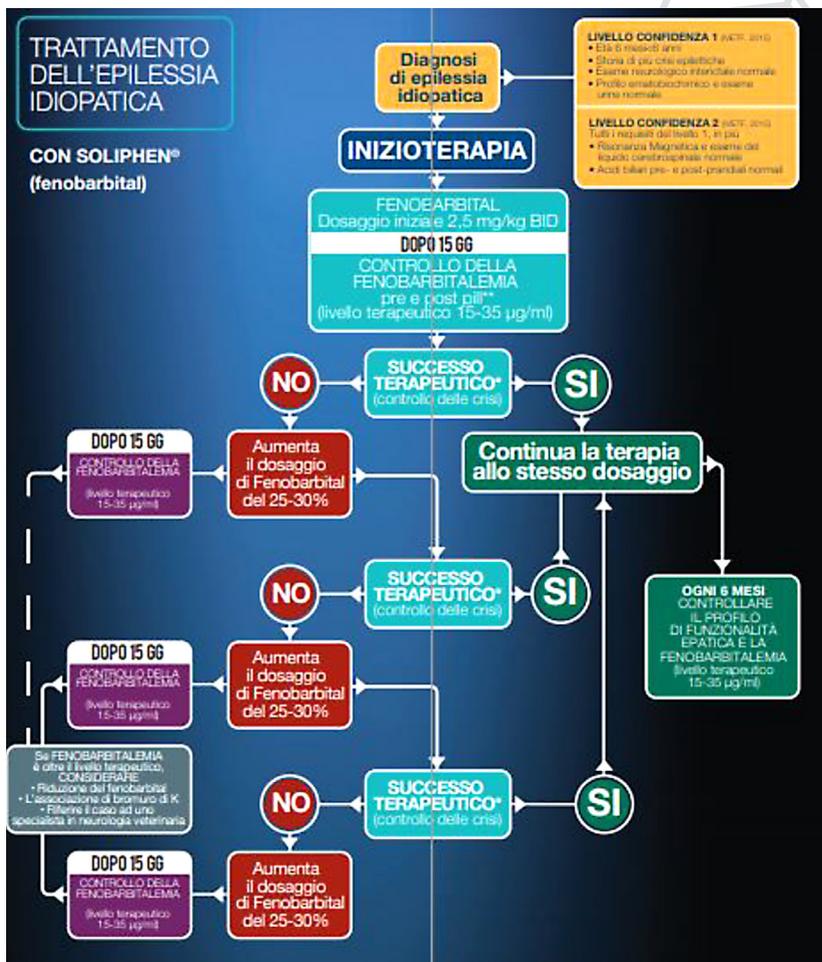


Immagine 1 – Algoritmo creato dal Prof. Gandini per Dechra che fornisce le linee guida per la gestione terapeutica con un fenobarbitale ad uso veterinario.

## IL PRELIEVO EMATICO NEL CONIGLIO

di Gustavo Picci



### Quali sono i siti per effettuare il prelievo ematico nel coniglio?

La vena safena laterale è il sito di accesso venoso più utilizzato nei conigli perché è un vaso di discrete dimensioni ed è facilmente individuabile.

Altri siti di prelievo, quali la vena e l'arteria auricolare, la giugulare, la vena cefalica e la puntura cardiaca, sono utilizzati in modo limitato. Il prelievo dai vasi auricolari potrebbe causare la necrosi ischemica della pinna auricolare. Dalla giugulare si possono prelevare campioni ematici abbondanti sebbene, a causa della difficoltà



di contenzione dei pazienti, spesso sia necessaria la sedazione. L'identificazione di questo vaso potrebbe essere difficoltosa nelle femmine che presentano giogaia abbondante. La vena cefalica è utilizzata in modo limitato perché la conformazione anatomica dell'avambraccio rende difficile l'emostasi e la localizzazione del vaso. Infine, la vena femorale può essere utilizzata con la stessa manualità impiegata nei cani e nei gatti (paziente in decubito laterale).

### **Come si effettua il prelievo dalla vena safena?**

Per prima cosa è preferibile eseguire la tricotomia della regione anatomica per evidenziare con facilità la vena. Successivamente un collaboratore immobilizza il coniglio coprendo con una mano la testa e gli occhi e con l'altra mano controlla il bacino e effettua una leggera extrarotazione dell'arto per ottenere la posizione di iperestensione. L'aiutante esercita la compressione manuale della vena.

### **Quanto sangue possiamo prelevare?**

Il volume ematico totale di un coniglio corrisponde a circa 55-65 ml/kg, il 6-10% può essere prelevato in sicurezza.

### **Cosa dobbiamo inviare al laboratorio per effettuare un profilo emato-biochimico completo?**

Il laboratorio effettua la lettura del quadro ematico su campioni conservati in EDTA e relativo striscio, per il profilo biochimico e l'elettroforesi sono richiesti circa 0,5-1 ml di siero.

Per visualizzare la manualità della procedura vi invitiamo a visualizzare il seguente video:

<http://www.mylav.net/blogc/view/186>

## AGGIORNAMENTO SUL MELANOMA DEL CAVO ORALE DEL CANE

intervista a Paolo Buracco



*Immagine 1 – esempi clinici di melanoma melanotico, parzialmente melanotico e amelanotico.*

Il nostro consulente in oncologia chirurgica, prof. Paolo Buracco, ha redatto un approfondito documento relativo al melanoma del cane.

Per chi volesse approfondire l'argomento, in allegato è disponibile un PDF liberamente scaricabile, che approfondisce diversi aspetti diagnostici e terapeutici relativi a questa importante neoplasia. Diamo qui soltanto alcuni spunti interessanti.

### **Caro Paolo, perché il melanoma orale nel cane è così clinicamente rilevante?**

PB: Il melanoma maligno (MM) è il più frequente tra i tumori orali del cane (30-40% delle neoplasie della bocca). Il MM orale è localmente molto aggressivo, con crescita rapida e coinvolgimento dell'osso sottostante (mandibola o mascella) nel 57% dei casi. Il tasso metastatico è elevato (oltre 80%).

### **Quali sono le presentazioni cliniche più comuni?**

PB: il MM può presentarsi in numerose forme (sessile per lo più, talora pedunculata) ed essere variamente pigmentato. I segni clinici possono essere molto variabili, dalle forme asintomatiche, a quelle caratterizzate da perdita dei denti, modificazione del profilo facciale, scialorrea/anoressia, esoftalmo, epistassi, ecc.

## Quali sono gli step diagnostici fondamentali?

PB: innanzitutto le biopsie (citologiche ed istologiche) con eventuale immunohistochimica; quindi la stadiazione clinica completa con diagnostica per immagini e campionamento dei linfonodi regionali. L'esame istologico è indispensabile anche per la valutazione dei margini di escissione chirurgica, e per fornire al clinico parametri utili per formulare una prognosi.

## Trattandosi di una neoplasia molto aggressiva, abbiamo a disposizione armi terapeutiche efficaci?

Le opzioni terapeutiche hanno lo scopo del controllo locale della neoplasia (chirurgia e/o radioterapia), e il controllo della malattia metastatica con presidi adiuvanti quali chemioterapia e terapia immunologica. Quest'ultima modalità, sebbene ancora in fase di studio e sperimentazione, ha mostrato, quando applicabile, risultati incoraggianti con tempi di sopravvivenza superiori alla combinazione di chirurgia e radioterapia.

## MELANOMA MALIGNO ORALE DEL CANE

di Paolo Buracco\*

Il melanoma maligno (MM) è il più frequente tra i tumori orali del cane (30-40% delle neoplasie della bocca). Ne sono predisposti cani di piccola taglia e quelli appartenenti a razze a mucosa pigmentata (Cocker Spaniel, Barbone, Pechinese, Gordon Setter, Chow Chow, Golden retriever e Bassotto). L'età media dei cani colpiti è 11,4 anni; la predisposizione di sesso è incerta (forse prevalenza nei maschi).

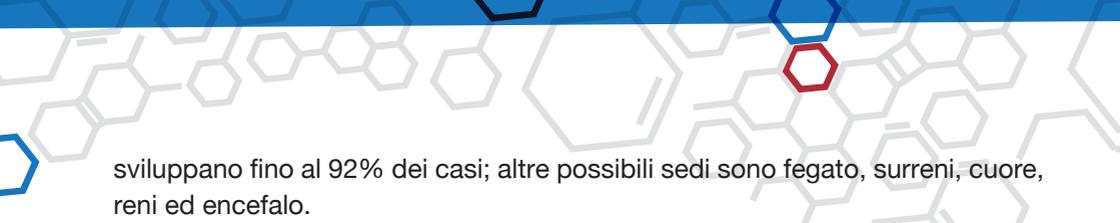
L'eziologia è sconosciuta ma la predisposizione di alcune razze supporta una base genetica sottostante. Il MM si localizza a livello di mucosa gengivale (42%), labiale e buccale (38%), palatale (11%), e lingua [7%]; tonsille e faringe sono colpite più raramente (1%) ma possono essere sede di metastatizzazione locale. Il MM orale

\* Dipl. ECVS, Prof. Ordinario, Clinica Chirurgica Veterinaria, Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino.

è localmente molto aggressivo, con crescita rapida e coinvolgimento dell'osso sottostante (mandibola o mascella) nel 57% dei casi. Il tasso metastatico è elevato (oltre 80%).

## DIAGNOSI

- **Clinica:** il MM orale cresce generalmente in forma sessile ma può anche essere peduncolato e variamente pigmentato o amelanotico. MM di meno di 1 cm sono spesso asintomatici e rinvenuti casualmente; quelli più grandi (3 o più cm) sono spesso ulcerati, sanguinanti e maleodoranti. Si possono rilevare anche mobilità localizzata/perdita di denti (per invasione ossea, fino alla frattura mandibolare), modificazioni del profilo facciale e perdita di saliva mista a sangue. Scialorrea, disfagia e difficoltà ad alimentarsi sono spesso presenti in caso di MM aborali; si osservano talvolta anche esoftalmo/deviazione del bulbo e dolore all'apertura della bocca (per invasione dell'orbita da parte di MM aborali dell'arcata superiore o della guancia) e starnuti/epistassi (per invasione nasale).
- **L'esame citologico** del tumore primario è eseguito da biopsia ad ago sottile o, preferibilmente, per impronta di biopsie incisionali. Il MM è un "grande imitatore", potendo in alcuni casi simulare neoplasie epiteliali (foglietti monostrato o aggregati di cellule molto coese tra loro), mesenchimali (cellule isolate di forma ovale o fusiforme), a cellule rotonde (cellule singole tondeggianti) o forme miste (Meinkoth et al 2014). Se pigmentati (granuli intracitoplasmatici di melanina), sono facilmente diagnosticabili; se amelanotici, sono spesso costituiti da cellule che mostrano un elevato grado di anaplasia e polimorfismo che rendono difficoltoso, se non impossibile, differenziarle da sarcomi o carcinomi poco differenziati (Friedrichs et al 2013).
- **Metastasi:** le prime sono in genere ai linfonodi regionali (mandibolari, retrofaringei mediali e parotidei, fino al 74% dei casi) (Piras et al 2017). Le loro dimensioni non sono un parametro accurato per stabilire il loro coinvolgimento (Williams e Packer, 2003; Grimes et al. 2017) e solo l'esame istologico (dopo linfoadenectomia) permette la diagnosi definitiva. L'interpretazione citologica di metastasi linfonodale può essere complicata per la presenza sia di melanociti neoplastici sia di melanofagi (macrofagi deputati alla raccolta di granuli di melanina, rilasciati per "incontinenza pigmentaria"). Le metastasi polmonari si



sviluppano fino al 92% dei casi; altre possibili sedi sono fegato, surreni, cuore, reni ed encefalo.

- **La diagnostica per immagini**, trattandosi di un tumore aggressivo, la TC total body è fondamentale per la stadiazione clinica TNM (linfadenopatie altrimenti non svelabili [linfonodi retrofaringei mediali] e metastasi polmonari di piccole dimensioni [2mm] o agli organi addominali), e per stabilire se e come eseguire l'escissione chirurgica (invasione di osso, spazio retrobulbare, cavità nasali). La TC è pertanto preferibile rispetto l'esame radiografico (di cranio e torace) ed ecografico dell'addome.
- **L'esame istologico** (da biopsia incisionale o escissionale en bloc) è essenziale per la diagnosi definitiva. Il MM, in base all'aspetto morfologico delle cellule, può essere suddiviso in: a) epitelioide (20% dei casi); b) fusato (35% dei casi); c) misto (40% dei casi); d) istotipi più rari (a cellule dendritiche, ballooniformi, a bersaglio e a cellule chiare, melanoma adenoide e forme con differenziazione osteocartilaginea da differenziare da osteo o condro-sarcoma). I MM poco aggressivi sono generalmente differenziati, pigmentati e non ulcerati (talvolta necessaria la decolorazione con permanganato di potassio per visualizzare le caratteristiche cellulari e nucleari); l'indice mitotico è basso. I MM aggressivi (la maggior parte nel cavo orale) sono caratterizzati da intensa attività giunzionale e invasione sottomucosale. Anche se questi tumori appaiono come noduli singoli ben definiti, l'esame istologico rivela, a livello intraepiteliale, più focolai neoplastici, pigmentati o non, per un'estensione laterale anche doppia rispetto alla neoplasia macroscopica. Nei MM invasivi le cellule a crescita epiteliale hanno di solito forma e dimensioni uniformi e sono più differenziate rispetto a quelle sottomucosali; possono essere le uniche a contenere pigmenti di melanina o a risultare positive all'esame immunoistochimico. Le cellule della porzione più profonda del tumore mostrano invece grande variabilità di forma e dimensioni, sia del citoplasma sia del nucleo. Il campione biptico dovrebbe includere il bordo della lesione e una porzione di mucosa intatta, tralasciando il centro ulcerato e spesso necrotico de MM (Ramos-Vara et al. 2000; Smith et al. 2002; Munday et al. 2017). L'esame istologico è indispensabile anche per l'esame dei margini di escissione chirurgica, e per fornire al clinico parametri utili per formulare una prognosi.
- **L'immunoistochimica** è fondamentale per la diagnosi definitiva. Il "cocktail" di anticorpi diretti verso Melan A, PNL2, TRP-1 e TRP-2 è caratterizzato da

sensibilità di circa 93%, più alta rispetto a quella degli stessi anticorpi utilizzati singolarmente, e da specificità del 100% (Smedley et al. 2011 A; Giudice et al. 2012).

– **I criteri più considerati per pronosticare il comportamento biologico del MM** sono (Spangler et al. 2006; Bergin et al. 2011; Smedley et al. 2011 B):

- indice mitotico (IM): numero di mitosi in 10 campi consecutivi ad alto ingrandimento (HPF). I MM con  $IM \geq 4$  per 10 HPF sono considerati più aggressivi.
- O grado di atipie nucleari (percentuale di nuclei alterati su 200 cellule contattate). I MM con grado di atipie  $\geq 30\%$  hanno prognosi peggiore; o Ki67 (proteina nucleare presente durante tutte le fasi del ciclo cellulare [G1-S-G2- M]) e non nella fase di quiescenza (G0). La sua espressione è considerata come indice di crescita tumorale. Le cellule con nucleo marcato sono contate in una griglia di 1 mm<sup>3</sup> ad alto ingrandimento e il valore del Ki67 è determinato come numero medio di cellule positive in 5 diversi campi. I MM con  $Ki67 \geq 19,5\%$  sono caratterizzati da comportamento più aggressivo.

## TERAPIA

Prevede il controllo locale della neoplasia (chirurgia e/o radioterapia), e il controllo della malattia metastatica con presidi adiuvanti quali chemioterapia e terapia immunologica.

- **L'escissione chirurgica** (mandibolectomia, maxillectomia, glossectomia, e resezione di labbro/guancia e ricostruzione con lembi locali o assiali) è, quando possibile, d'elezione (Boston et al. 2014). Il margine chirurgico deve essere, se possibile, di almeno 2-3 cm per l'osso e di 2 cm (anche se l'osso non appare eroso alla diagnostica per immagini) per i tessuti molli. Contestualmente, si rimuovono i linfonodi regionali per la loro valutazione istologica.
- **La radioterapia** è indicata come unico trattamento per MM inoperabili (Cancedda et al 2016) o come adiuvante dopo resezione incompleta. I protocolli ipofrazionati (8 Gy/settimana per 3 settimane o 9 Gy/settimana per 4 settimane) sembrano in grado di superare la radioresistenza del MM osservata in caso di iperfrazionamento (risposta dell'82%-94%, parziale del 25%-31% e completa del 51%-69%). L'irradiazione è estesa anche alle aree sede dei linfonodi regio-



nali, anche se rimossi (Bateman et al. 1994; Proulx et al. 2003; Murphy et al. 2005).

- **Chemioterapia:** il carboplatino non ha fatto registrare miglioramenti in termini di sopravvivenza rispetto al solo trattamento locale (Rassnick et al. 2001; Murphy et al. 2005; Brockley et al. 2013; Boston et al. 2014; Dank et al. 2014). Farmaci sono stati anche erogati in forma d’impianto a rilascio lento di cisplatino o, mediante elettrochemioterapia, dopo inoculazione intralesionale o sistemica di bleomicina (Spugnini et al. 2006).
- **Recentemente, è stata dimostrata l’espressione, nel MM, di recettori COX2** (la Ciclo-ossigenasi è stata associata a proliferazione tumorale, incremento della neoangionesi e infiltrazione linfocitaria e macrofagica). L’utilizzo di piroxicam, in associazione a farmaci come la ciclofosfamida e la talidomide in regime metronomico sembra associarsi a inibizione dell’angiogenesi e diminuzione dei microcapillari tumorali (Martinez et al. 2011; Choisunirachon et al. 2013; Gregorio et al. 2016). Anche l’uso di toceranib fosfato, inibendo recettori tirosin-chinasici come VEGF e PDGFR2 sembra potersi utilizzare in regime metronomico per il trattamento del MM (Wouda et al. 2017).
- **L’immunoterapia**, visto lo scarso successo delle terapie convenzionali, è l’alternativa “adiuvante” più studiata; di notevole interesse sono i vaccini a DNA. La vaccinazione contro il cancro si basa sul fatto che le cellule neoplastiche, a seguito di modificazioni genetiche, esprimono sulla superficie cellulare antigeni ed epitopi differenti rispetto alle cellule normali. La vaccinazione ha lo scopo di “addestrare” il sistema immunitario a riconoscere questi nuovi epitopi e a generare linfociti B e T specifici (Cavallo et al. 2014). Il vaccino a DNA consiste in un plasmide codificante per uno o più TAA (Tumor Associated Antigen), con attivazione del sistema immunitario per una risposta umorale e cellulomediata diretta contro le cellule tumorali positive per quel TAA. Il primo vaccino a DNA ideato per il cane è stato ONCEPT (Merial). In uno studio di fase I del 2003, Bergman et al. dimostrano sicurezza ed efficacia di un vaccino a DNA codificante per la tirosinasi umana in cani affetti da MM (Bergman et al. 2003). Il protocollo prevede l’inoculo del plasmide per via transdermica, mediante un needle-free injection system, ogni 2 settimane per 4 trattamenti e successivi richiami semestrali. Il vaccino è risultato sicuro, con pochi effetti collaterali locali e nessuna tossicità sistemica (Bergman et al. 2003 e 2006; Grosenbaugh et al. 2011).

Grazie a questi risultati è seguita l'approvazione, da parte del Dipartimento dell'Agricoltura Statunitense, di questo primo vaccino a DNA, anti-tirosinasi umana, per il trattamento del MM del cane. Studi più recenti hanno però messo in discussione la costante efficacia di ONCEPT poiché i cani trattati non hanno mostrato differenze significative di sopravvivenza rispetto ai cani solo operati (Ottnod et al. 2013; Treggiari et al. 2016; Verganti et al. 2016). I limiti di tale vaccino possono essere collegati alla scelta dell'antigene. La tirosinasi è espressa, infatti, in una percentuale limitata di MM; inoltre, non giocherebbe un ruolo oncogenico fondamentale per le cellule tumorali.

- La scelta del TAA-target è fondamentale per il successo della vaccinazione. Il CSPG4, oncoantigene di classe 1 espresso in circa il 60% dei MM (Mayayo et al 2011), ha un ruolo centrale nella proliferazione, adesione, migrazione e sopravvivenza dei melanociti neoplastici. Il CSPG4 è caratterizzato da distribuzione ridotta nei tessuti sani e, nell'uomo, è over-espresso nelle cellule di melanoma, oligodendrocitoma, glioma, leucemia linfoblastica acuta, carcinoma renale, condrosarcoma, carcinoma pancreatico e carcinoma mammario. È espresso inoltre dai periciti presenti nel microambiente tumorale. Nel cane, il TTA-CSPG4 è over-espresso anche nell'osteosarcoma. L'iniezione tramite elettroporazione evoca un aumento della risposta immunitaria antigene-specifica. L'elettroporazione utilizza brevi impulsi elettrici per creare una temporanea permeabilizzazione della membrana cellulare e permettere così alle molecole di DNA (iniettate per via intramuscolare) di penetrare nella cellula; appena cessato lo stimolo elettrico, i "pori" di membrana si chiudono senza causare morte cellulare. L'elettroporazione funziona anche da adiuvante; infatti, l'inserimento degli aghi e gli impulsi elettrici erogati causano un danno tissutale locale con conseguente liberazione di citochine infiammatorie e richiamo di cellule dendritiche, macrofagi e linfociti nel sito d'inoculo, cui segue il trasporto ai linfonodi. Lo svantaggio principale della procedura è l'obbligo dell'anestesia generale (Impellizeri et al 2014). I cani, per essere candidati alla vaccinazione adiuvante anti-CSPG4, devono essere portatori di MM orale positivo all'espressione di CSPG4 (Mayayo et al 2011); in tal caso, i cani entrano, dopo stadiazione clinica ed escissione chirurgica locale (tumore primario e linfonodi), in un protocollo che prevede due vaccinazioni a distanza di 15 giorni e successive vaccinazioni mensili (Piras et al 2017). I cani trattati con vaccinazione adiuvante anti-CSPG4

(human) hanno fatto registrare una percentuale di sopravvivenza a 6, 12, 18, 24 mesi rispettivamente del 95,6%, 73,9%, 47,8%, 30,4% con sopravvivenza mediana di 684 giorni (Piras et al. 2017). Sono in corso ulteriori studi.

- I cani affetti da MM orale trattati solo con chirurgia e/o radioterapia sono caratterizzati da una sopravvivenza mediana di 352 giorni, con una percentuale di pazienti vivi a 1 anno del 29% (Boston et al. 2014). L'uso della chemioterapia non modifica queste sopravvivenze.

## BIBLIOGRAFIA ESSENZIALE

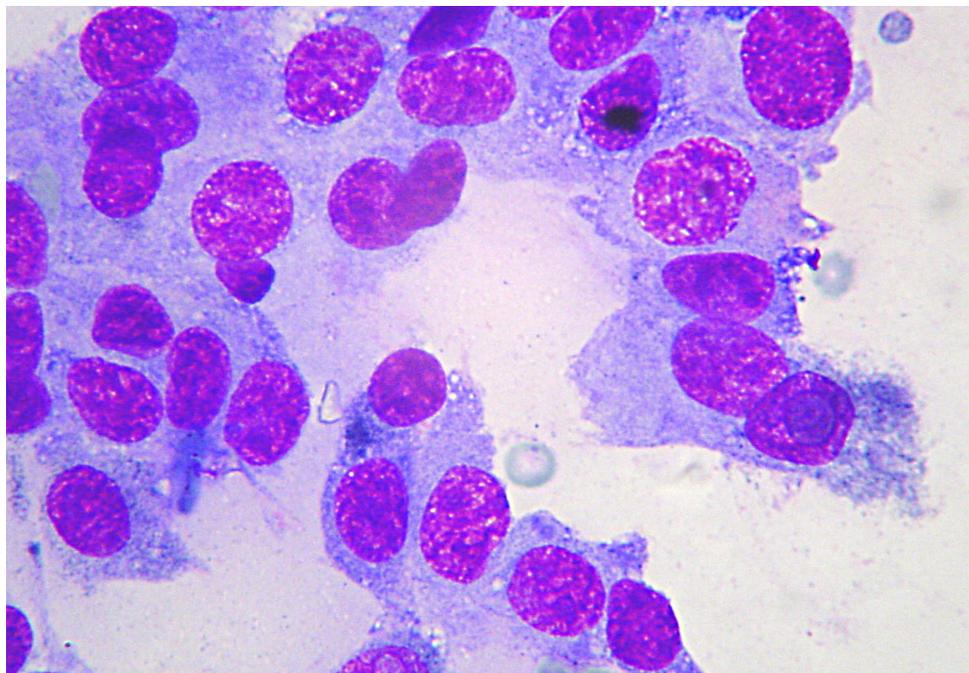
1. Bateman KE, Catton PA, Pennock PW et al. 0-7-21 radiation therapy for the treatment of canine oral melanoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 8:267-272, 1994
2. Bergin I L, Smedley RC, Esplin DG et al. Prognostic evaluation of Ki67 threshold value in canine oral melanoma. *Veterinary Pathology* 48:41-53, 2011
3. Bergman PJ, McKnight J, Novosad A, et al. Long-term survival of dogs with advanced malignant melanoma after DNA vaccination with xenogeneic human tyrosinase: a phase I trial. *Clinical Cancer Research* 9:1284-1290, 2003
4. Bergman PJ, Camps-Palau MA, McKnight JA, et al. Development of a xenogeneic DNA vaccine program for canine malignant melanoma at the Animal Medical Center. *Vaccine* 24(21):4582-5, 2006
5. Boston SE, Lu X, Culp WT, et al. Efficacy of systemic adjuvant therapies administered to dogs after excision of oral malignant melanomas: 151 cases (2001-2012). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 245(4):401-407, 2014
6. Brockley LK, Cooper MA, Bennett PF. Malignant melanoma in 63 dogs (2001-2011): the effect of carboplatin chemotherapy on survival. *New Zealand Veterinary Journal* 61(1), 25-31, 2013
7. Cavallo F, Aurisicchio L, Mancini R, Ciliberto G. Xenogene vaccination in the therapy of cancer. *Expert Opin Biol Ther* 14:1427-42, 2014
8. Choisunirachon N, Jaroensong T, Yoshida K. Effects of low-dose cyclophosphamide with piroxicam on tumour neovascularization in a canine oral malignant melanoma-xenografted mouse model. *Veterinary and Comparative Oncology* 13(4): 424-432, 2013
9. Dank G, Rassnick KM, Sokolovsky Y, et al. Use of adjuvant carboplatin for treatment of dogs with oral malignant melanoma following surgical excision. *Veterinary and Comparative Oncology* 12:78- 84, 2014
10. Friedrichs KR, Young KM. Diagnostic Cytopathology in Clinical Oncology. In Withrow SJ, Vail DM, Page RL (eds), *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*, 5th ed. St Louis, MO: WB Saunders, pp. 111-130, 2013
11. Giudice C, Cecilian F, Rondena M, et al. Immunohistochemical investigation of PNL2 reactivity of canine melanocytic neoplasms and comparison with Melan A. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 22(3): 389-94 2010
12. Gregorio H, Raposo TP, Queiroga FL. Investigating associations of cyclooxygenase-2 expression with angiogenesis, proliferation, macrophage and T-lymphocyte infiltration in canine melanocytic tumours. *Melanoma Research* 26:338-347, 2016
13. Grimes J, Matz B, Christopherson P, et al. Agreement Between Cytology and Histopathology for Regional Lymph Node Metastasis in Dogs With Melanocytic Neoplasms. *Veterinary Pathology* 54(4):579-587, 2017

14. Grosenbaugh DA, Leard T, Bergman PJ, et al. Safety and efficacy of a xenogeneic DNA vaccine encoding for human tyrosinase as adjunctive treatment for oral malignant melanoma in dogs following surgical excision of the primary tumor. *American Journal of Veterinary Research* 72:1631–1638, 2011
15. Impellizeri JA, Ciliberto G, Aurisicchio L. Electro-gene-transfer as a new tool for cancer immunotherapy in animals. *Veterinary and Comparative Oncology* 12(4):310-318, 2014
16. Martinez CM, Peñafiel-Verdú C, Vilafranca M, et al. Cyclooxygenase-2 expression is related with localization, proliferation, and overall survival in canine melanocytic neoplasms. *Veterinary Pathology* 48:1204–1211, 2011
17. Mayayo SL, Prestigio S, Maniscalco L, et al. Chondroitin sulfate proteoglycan-4: a biomarker and a potential immunotherapeutic target for canine malignant melanoma. *The Veterinary Journal* 190:e26–30, 2011
18. Meinkoth JH, Cowell RL, Tyler RD. Cell Types and Criteria of Malignancy. In Cowell RL, Valenciano AC (eds), *Cowell and Tyler's Diagnostic cytology and hematology of the dog and cat*, 4th ed., Elsevier Inc. St. Louis, MO, USA, pp. 20-47, 2014
19. Munday J.S, Löhr CV, Kiupel M. Tumors of the Alimentary Tract. In Meuten D.J, *Tumors in Domestic Animals*, 5th ed., Ames, Iowa, USA. John Wiley & Sons, Inc., pp. 499-601, 2017
20. Murphy S, Hayes AM, Blackwood L, et al. Oral malignant melanoma: the effect of coarse fractionation alone or with adjuvant carboplatin therapy. *Veterinary Comparative Oncology* 3:222–229, 2005
21. Ottnod JM, Smedley RC, Walshaw R, et al.; A retrospective analysis of the efficacy of Oncept vaccine for the adjunct treatment of canine oral malignant melanoma. *Veterinary Comparative Oncology* 11:219–29. 2013
22. Piras LA, Riccardio F, Iussich S, Maniscalco L, Gattino F, Martano M, et al. Prolongation of survival of dogs with oral malignant melanoma treated by en bloc surgical resection and adjuvant CSPG4-antigen electrovaccination. *Veterinary Comparative Oncology* 15(3):996-1013, 2017.
23. Proulx DR, Ruslander DM, Dodge RK, et al. A retrospective analysis of 140 dogs with oral melanoma treated with external beam radiation. *Vet Radiol Ultrasound*.44:352–359. 2003
24. Ramos-Vara, JA, Beissenherz ME, Miller MA, et al. Retrospective study of 338 canine oral melanomas with clinical, histologic, and immunohistochemical review of 129 cases. *Veterinary Pathology* 37:597–608, 2000
25. Rassnick KM, Ruslender DM, Cotter SM, et al. Use of carboplatin for treatment of dogs with malignant melanoma: 27 cases (1989–2000). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 218:1444–1448, 2001
26. Smedley RC, Spangler WL, Esplin DG, et al. Prognostic markers for canine melanocytic neoplasms: A comparative review of the literature and goals for future investigation. *Veterinary Pathology* 48:54–72. 2011 B
27. Smedley RC, Lamoureux J, Sledge DG, et al. Immunohistochemical diagnosis of canine oral amelanotic melanocytic neoplasms. *Veterinary Pathology* 48: 32–40. 2011 A
28. Smith H, Goldschmidt H, Mcmanus PM. A Comparative review of melanocytic neoplasms. *Veterinary Pathology* 39:651–678 2002
29. Spangler WL, Kass PH. The Histologic and Epidemiologic Bases for Prognostic Considerations in Canine Melanocytic Neoplasia. *Veterinary Pathology* 43:136–149, 2006
30. Spugnini E, Dragonetti E, Vincenzi B, et al. Pulse-mediated chemotherapy enhances local control and survival in a spontaneous canine model of primary mucosal melanoma *Melanoma Res* 16:23–27 2006
31. Treggiari E, Grant JP, North SM. A retrospective review of outcome and survival following surgery and adjuvant xenogeneic DNA vaccination in 32 dogs with oral malignant melanoma. *J Vet Med Sci* 78(5):845-50. 2016

- 
32. Verganti S, Berlato D, Blackwood L, et al. Use of Oncept melanoma vaccine in 69 canine oral malignant melanomas in the UK. *Journal of Small Animal Practice* 58(1):10-16, 2017
  33. Williams LE, Packer RA. Association between lymph node size and metastasis in dogs with oral malignant melanoma: 100 cases (1987-2001). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 222(9):1234–1236, 2003
  34. Wouda RM, Hocker SE, Higginbotham ML. Safety evaluation of combination carboplatin and toceranib phosphate (Palladia) in tumour-bearing dogs: A phase I dose finding study. *Veterinary 6 Comparative Oncology* 16:E52–E60, 2017
  35. Cancedda S, Rohrer Bley C, Aresu L, Dacasto M, Leone VF, Pizzoni S, Gracis M, Marconato L. Efficacy and side effects of radiation therapy in comparison with radiation therapy and temozolomide in the treatment of measurable canine malignant melanoma. *Veterinary Comparative Oncology* 14(4):e146-e157, 2016.

## UN NUOVO MARKER PER IL MELANOMA CANINO (NOVITÀ 2019)

lo staff dei Patologi MyLav



*Immagine 1 - Aspetto citologico di un melanoma poco pigmentato del cavo orale in un cane.*

Da quest'anno abbiamo la possibilità di offrirvi un'importante novità nella valutazione immunoistochimica dei melanomi del cane: la ricerca dell'espressione del CSPG4.

Il Condroitin Solfato Proteoglicano-4 (CSPG4), noto anche come antigene melanoma-associato ad alto peso molecolare (HMW-MAA), è espresso a livello di membrana dalle cellule di melanoma umano e canino (1,2).

Il CSPG4 svolge un ruolo chiave nella progressione maligna e metastatizzazione del melanoma (2), oltre a costituire un nuovo potenziale marcatore immunoistochimico per il melanoma nel cane.

Nell'uomo e nel cane, CSPG4 è un ideale bersaglio immunoterapeutico (tumor-associated antigen) (2).

Utilizzando come vaccino a DNA la proteina CSPG4 umana (human Chondroitin Sulfate Proteoglycan-4 - hCSPG4) alcuni autori (3,4) hanno dimostrato come, nei cani con melanoma orale in stadio II e III trattati chirurgicamente, l'elettrovaccinazione prolunghi significativamente i tempi di sopravvivenza, stimolando la produzione di anticorpi specifici rispetto a cani con melanoma CSPG4 positivo operati ma non vaccinati (sopravvivenza mediana di 684 giorni nei vaccinati rispetto ai 200 giorni nei non vaccinati).

L'utilizzo del plasmide chimera uomo-cane (HuDo-CSPG4) ha permesso di ottenere risultati analoghi (dati non ancora pubblicati). Come termine di paragone, i cani con melanoma orale trattati solo con chirurgia possono beneficiare di una sopravvivenza mediana di circa 330 giorni, con solo il 29-30% dei cani vivo a 1 anno (5).

Al fine di un possibile trattamento con vaccino, è necessario effettuare uno screening immunoistochimico al fine di verificare l'espressione o meno di CSPG4: i candidati ideali per il trattamento adiuvante saranno i cani con melanoma positivo per tale marker mentre gli altri non avranno un beneficio, e la terapia vaccinale sarà pertanto da evitare.

## Bibliografia:

Mayayo SL, Prestigio S, Maniscalco L, La Rosa G, Aricò A, De Maria R, Cavallo F, Ferrone S, Buracco P, Iussich S. Chondroitin sulfate proteoglycan-4: a biomarker and a potential immunotherapeutic target for canine malignant melanoma. *Vet J.* 190(2):e26-30, 2011.

Rolih V, Barutello G, Iussich S, De Maria R, Quagliano E, Buracco P, Cavallo F, Riccardo F. CSPG4: a prototype oncoantigen for translational immunotherapy studies. *J Transl Med.* 2017 Jul 1;15(1):151

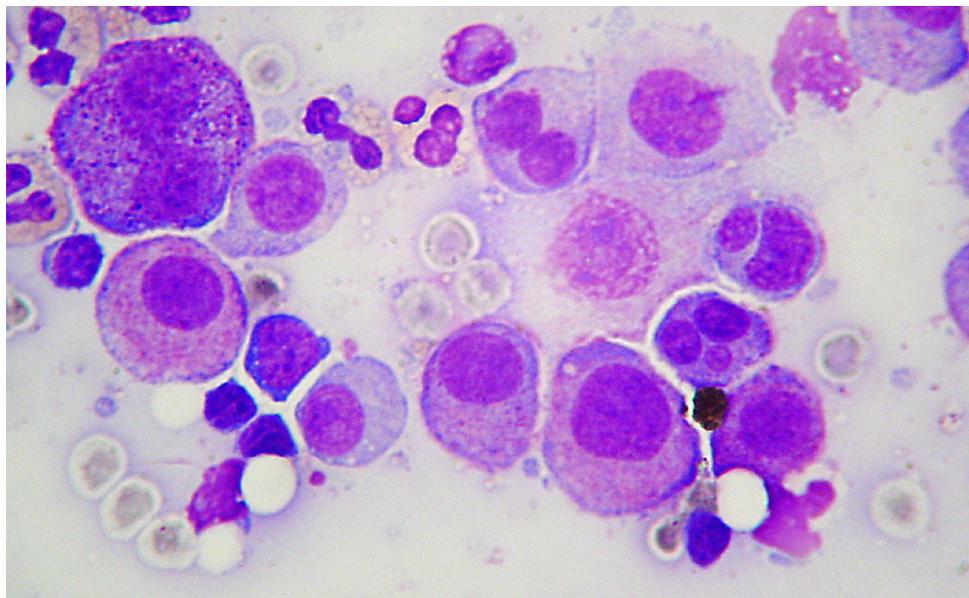
Riccardo F, Iussich S, Maniscalco L, Lorda Mayayo S, La Rosa G, Arigoni M, De Maria R, Gattino F, Lanzardo S, Lardone E, Martano M, Morello E, Prestigio S, Fiore A, Quagliano E, Zabarino S, Ferrone S, Buracco P, Cavallo F. CSPG4-specific immunity and survival prolongation in dogs with oral malignant melanoma immunized with human CSPG4 DNA. *Clin Cancer Res.* 20(14):3753-62, 2014.

Piras LA, Riccardo F, Iussich S, Maniscalco L, Gattino F, Martano M, Morello E, Lorda Mayayo S, Rolih V, Garavaglia F, De Maria R, Lardone E, Collivignarelli F, Mignacca D, Giacobino D, Ferrone S, Cavallo F, Buracco P. Prolongation of survival of dogs with oral malignant melanoma treated by en bloc surgical resection and adjuvant CSPG4-antigen electrovaccination. *Vet Comp Oncol.* 15(3):996-1013, 2017.

Boston SE, Lu X, Culp WT, Montinaro V, Romanelli G, Dudley RM, Liptak JM, Mestrinho LA, Buracco P. Efficacy of systemic adjuvant therapies administered to dogs after excision of oral malignant melanoma: 151 cases (2001-2012) *J Am Vet Med Assoc.* 245(4):401-7, 2014.

## LE MUTAZIONI C-KIT DEL MASTOCITOMA (NOVITÀ 2019)

di Laura Marconato & Luca Aresu



*Immagine 1 - Mastocitoma poco differenziato in un cane.*

Da Gennaio 2019 il laboratorio MyLav è in grado di eseguire un pannello esteso per valutare le mutazioni del gene c-Kit, che include nuove possibili sedi di mutazione.

Abbiamo chiesto ai nostri consulenti Laura Marconato e Luca Aresu, di spiegarci come sfruttare questo test in oncologia.

### **Quando richiedere l'esame mutazionale?**

L'esame mutazionale del gene c-Kit, nel cane con mastocitoma a localizzazione dermica o sottocutanea, può essere richiesto sia per avere un parametro prognostico (che va ad unirsi al grado istologico e allo stadio clinico), sia per guidarci nella scelta della terapia medica, laddove questa sia indicata.

## **KIT è un recettore tirosin-chinasico? c-Kit allora cos'è?**

I recettori tirosin-chinasici, tra cui KIT, sono una famiglia di proteine recettoriali che si attivano dopo legame con un fattore di crescita, e sono in grado di regolare la crescita, la differenziazione e la morte cellulare. Per c-Kit si intende il gene che codifica per la proteina KIT.

## **Cosa succede se il relativo gene c-Kit è mutato?**

Se c-Kit è mutato, il recettore KIT non necessita del fattore di crescita per attivarsi, ma rimane costantemente in tale forma con conseguente crescita cellulare incontrollata.

Nel cane, il gene c-Kit gioca un ruolo eziopatogenetico importante nel mastocitoma, e la mutazione in uno o più esoni comporta la presenza di un segnale aberrante con crescita incontrollata dei mastociti.

La prima mutazione ad essere stata identificata è la duplicazione interna a tandem (ITD) che interessa il dominio iuxta-membranario di KIT (codificato dall'esone 11), la quale determina un'attivazione costitutiva del recettore in assenza di ligando.

I MCT dermici presentano nel 9-30% dei casi una ITD, soprattutto se di alto grado e con tendenza a metastatizzare. Tuttavia, è ampiamente documentata in letteratura la presenza di mutazioni anche in mastocitomi di basso grado istologico. Più recentemente sono state identificate mutazioni puntiformi attivanti e ITD in corrispondenza del dominio extracellulare a livello di esoni 8 e 9. Altri esoni, tra cui 14 e 17, sono invece raramente mutati.

Sebbene la letteratura non riporti la presenza di mutazioni ITD sull'esone 11 nei mastocitomi sottocutanei, da dati preliminari si evince invece che è presente una ITD sull'esone 8.

## **L'esame mutazionale può darci indicazioni prognostiche?**

La presenza di mutazioni (soprattutto ITD) a carico di alcuni esoni di c-Kit è stata associata ad una prognosi peggiore, da intendersi come maggior rischio di recidiva locale e di morte.

Sebbene la presenza di mutazioni a carico di c-Kit si associ significativamente al pattern immunoistochimico III KIT, molti mastocitomi possono mostrare espressione aberrante della proteina KIT (pattern III), senza però che vi sia la mutazione.

## **Come si utilizza l'esame mutazionale per la scelta terapeutica?**

L'evidenza che le mutazioni di c-Kit giochino un ruolo importante nell'eziopatogenesi del mastocitoma canino, pone le basi per l'utilizzo a scopo terapeutico degli inibitori tirosin-chinasici.

**Masitinib** è un inibitore tirosin-chinasico che in uno studio prospettico, randomizzato, controllato da placebo (trial clinico di fase 3) migliorava il tempo alla progressione in cani con mastocitoma recidivante o non operabile di grado 2 o 3 di Patnaik, soprattutto se utilizzato come farmaco di prima linea. Il farmaco è in grado di inibire anche altri recettori (PDGF e FGFR3).

Secondo le direttive EMA (European Medicines Agency-Europa): Masitinib treatment should only be used in dogs with non-resectable mast cell tumours, which express the mutated c-kit tyrosine kinase receptor. The presence of a mutated tyrosine kinase c-kit receptor must be confirmed prior to treatment.

Pertanto l'utilizzo di Masitinib è indicato solo se la mutazione ITD è confermata.

**Toceranib** è un inibitore tirosin-chinasico multitarget (KIT, VEGFR2, PDGFRb) che ha mostrato efficacia (tasso di risposta 37.2%) in regime adiuvante nei confronti di MCT di grado 2 e 3 di Patnaik recidivanti.

I cani in cui era presente una mutazione rispondevano meglio, generalmente entro 3 mesi dall'inizio della terapia. In particolare, nei mutati versus wild type (non mutati), il tasso di risposta era di 69% vs 37%.

Inizialmente, toceranib è stato somministrato al dosaggio di 3.25 mg/kg a giorni alterni. Più recentemente è stato documentato che un dosaggio pari a 2.4 mg/kg è parimenti efficace, ma con minore tossicità sistemica.

Secondo le direttive EMA (European Medicines Agency-Europa): *Toceranib induces cell cycle arrest and subsequent apoptosis in tumour cell lines expressing activating mutations in the split kinase RTK, c-Kit. Dogs carrying wild-type c-kit and dogs carrying mutated c-kit responded significantly better to treatment as compared to placebo.*

Pertanto, Toceranib può dare risposte oggettive anche in cani con mastocitomi wild-type, interagendo con recettori diversi da KIT. Purtroppo, oggi non è possibile prevedere a priori se il cane con mastocitoma wild-type risponderà o meno alla terapia con Toceranib.

Infine, non è certo il ruolo di questi farmaci (sia Masitinib sia Toceranib) nel regime adiuvante (malattia microscopica); in un unico studio retrospettivo, masitinib determinava una sopravvivenza inferiore rispetto alla chemioterapia tradizionale in cani con mastocitoma ridotto chirurgicamente.

## LO STUDIO PERIMETRALE DEI MARGINI DI ESCISSIONE CHIRURGICA (NOVITÀ 2019)

di Luisa Vera Muscatello & Luca Aresu

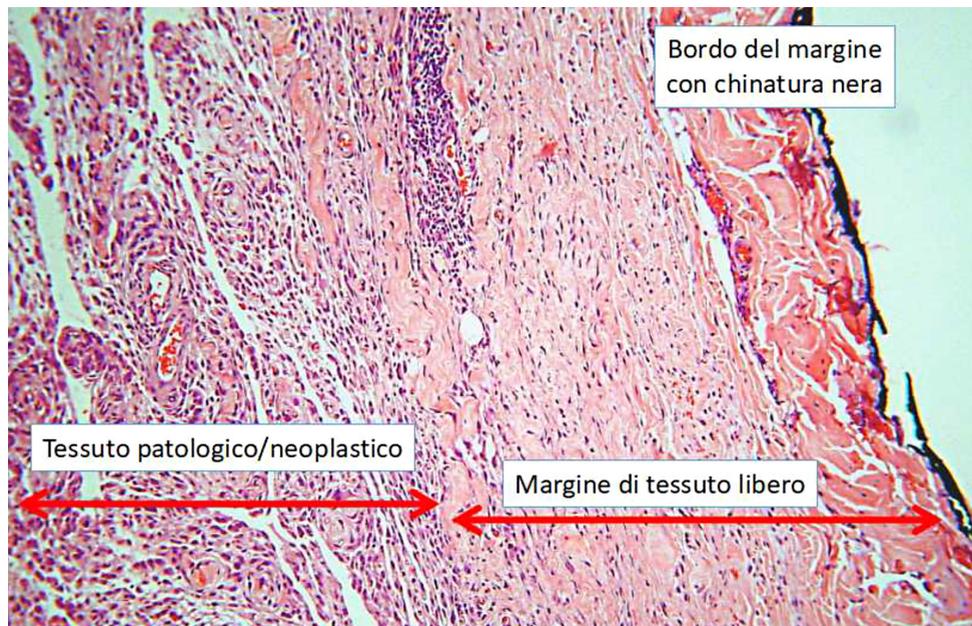


Immagine 1 - Studio dei margini di un campione istologico.

Da gennaio 2019, il nostro laboratorio offre un ulteriore servizio di istopatologia: **lo studio dei margini perimetrali di escissione chirurgica.**

### **Cosa si valuta in generale quando si analizzano i margini di escissione?**

Attraverso la valutazione istologica dei margini di escissione chirurgica, il patologo valuta la distanza della neoplasia rispetto al limite dell'exeresi chirurgica, ovvero la possibilità di una residua presenza di tessuto patologico nel paziente. Sulla base

di tale informazione, quando un tumore si estende fino al margine chirurgico, nella sezione istologica, viene descritto come neoplasia che infiltra i limiti chirurgici dell'exeresi (gergalmente chiamato margine “**sporco**”).

L'infiltrazione del margine può essere ulteriormente interpretata come a distribuzione massiva (infiltrazione diffusa) o con aggregati-propaggini di cellule neoplastiche (infiltrazione focale).

Al contrario, i margini di escissione chirurgica vengono considerati **esigui** quando la neoplasia non infiltra il margine, ma si localizza in prossimità dello stesso, a meno di 2 mm dal margine della sezione istologica.

Infine, i margini vengono considerati **liberi**, quando le celle neoplastiche si trovano ad una distanza  $\geq 2$  mm dal margine nella sezione istologica.

## **Perché si valutano margini di escissione e qual è l'importanza clinica nei diversi tumori?**

I margini si valutano al fine di predire il rischio di recidiva locale in seguito all'infiltrazione tumorale del tessuto residuo sull'animale. Alcuni tumori, nello specifico quelli caratterizzati da un comportamento biologico aggressivo e con un elevato grado istologico, quali sarcomi dei tessuti molli e mastocitoma del cane, sarcoma da inoculo e carcinomi mammari felini, sono neoplasie che necessitano di una ampia escissione chirurgica, e per cui l'infiltrazione dei margini implica un rischio di recidiva locale elevato.

## **Come orientare i margini?**

Al fine di stabilire l'orientamento del campione chirurgico per la successiva indagine istologica dei margini, è consigliabile apporre dei punti di sutura che siano indicativi della localizzazione anatomica del campione rispetto all'animale. I punti di sutura possono essere apposti indicando le proiezioni anatomiche craniale, caudale, dorsale e ventrale (Fig.1 e 2).

In tal modo, l'eventuale presenza di un margine specifico (es. il margine craniale) infiltrato dalla neoplasia sarà più facilmente rivalutabile per una successiva revisione chirurgica.

## Perché colorare il margine con inchiostro di china?

Perché l'inchiostro di china apposto subito dopo l'asportazione chirurgica sulla superficie prossimale del tessuto escisso, rappresentato ad esempio in una neoplasia cutanea dalla porzione di sottocute e/o fascia muscolare, diventa una reale linea di demarcazione visibile sulla sezione istologica (vedi ad esempio l'immagine istologica sopra). Il rischio della valutazione di margini non chinati è legato al fatto che il reale limite del campione non venga raggiunto con il taglio di una singola sezione istologica comprendente il nodulo. Inchiostri di china di colori diversi possono essere utilizzati ugualmente per l'orientamento dei margini. In questo caso ogni margine (craniale, caudale, dorsale e ventrale) sarà colorato con un colore diverso.

## Quale tecnica di marginazione selezionare?

Il campionamento dei margini in patologia veterinaria può essere ottenuto con due metodiche o con una combinazione delle stesse:

- tecnica del cross-sectioning.
- Marginazione perimetrale.

La tecnica del **cross-sectioning**, si esegue sezionando il campione lungo il suo asse corto, e successivamente le due metà ottenute lungo il loro asse lungo (Fig.1). Questa metodica consente di ottenere massimo 4 sezioni istologiche, e pur rimanendo una tecnica low-cost, consente solo una valutazione limitata della superficie totale dei margini chirurgici.

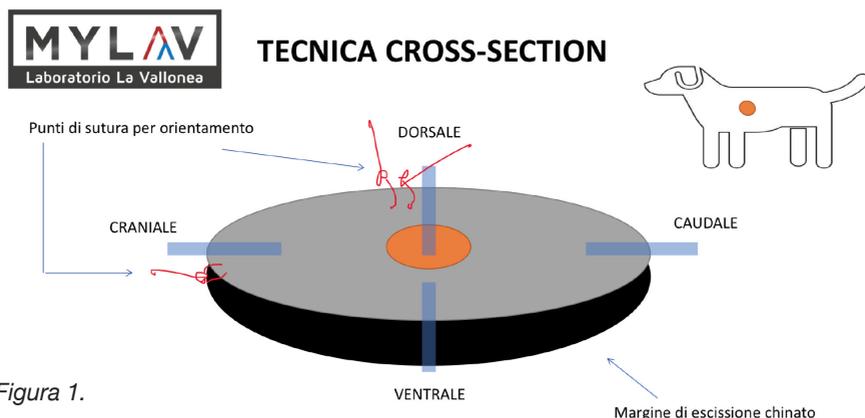


Figura 1.

La **marginazione perimetrale**, invece, anche nota come tecnica di tangential-sectioning, fornisce una più completa valutazione dei margini di escissione chirurgica (Fig.2). Si esegue effettuando sezioni continue lungo tutto il perimetro limite del campione. Utilizzando questa tecnica, se sono presenti cellule neoplastiche nelle sezioni istologiche i margini saranno considerati infiltrati. Ovviamente queste procedure vengono effettuate in laboratorio dal personale del settore di patologia a partire dalle biopsie chirurgiche ricevute.



## TECNICA MARGINI PERIMETRALI

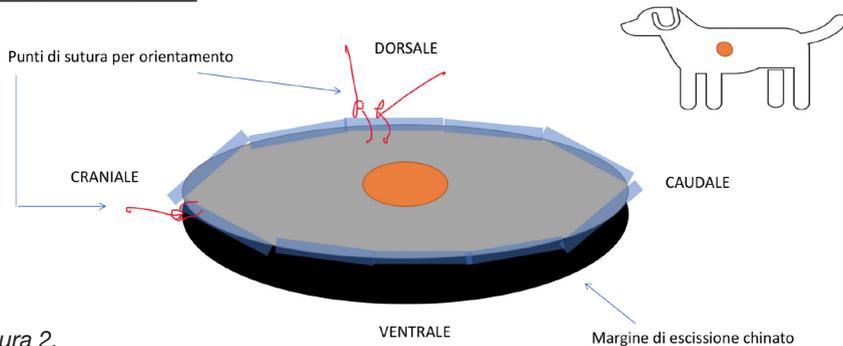


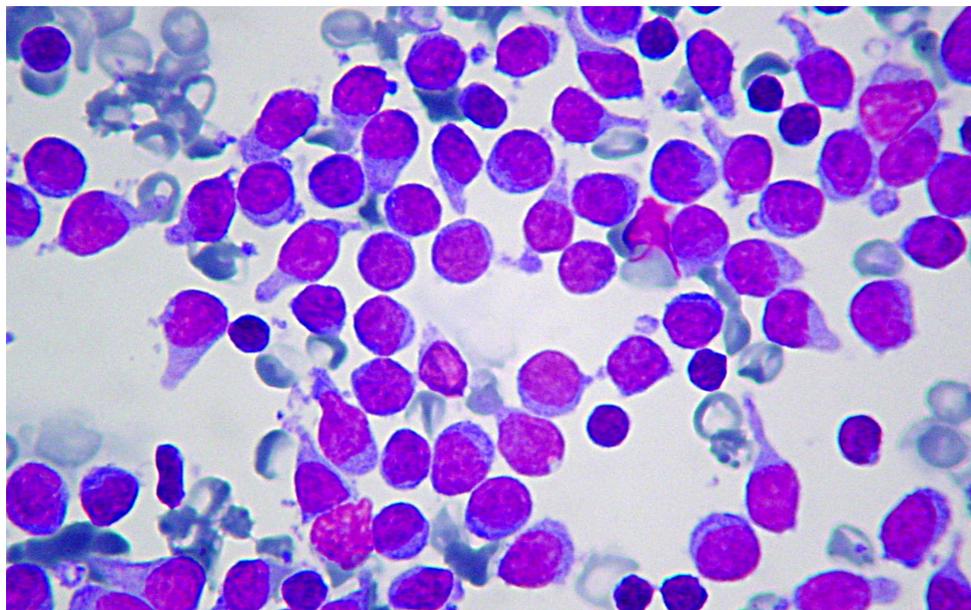
Figura 2.

## Bibliografia

- Billir et al., 2016 AAHA Oncology Guidelines for Dogs and Cats. JAAHA 2016 Jul-Aug;52(4):181-204.
- Stromberg and Meuten. Trimming Tumors for Diagnosis and Prognosis, chapter 2 in: Tumors in Domestic Animals, 5th edition, 2017, Wiley Blackwell, Iowa USA.
- Goldschmidt et al. Identification and assessment of tumor margins. In: Surgical Pathology of Tumors of Domestic Animals Volume 1 – Epithelial Tumors of the Skin, edited by M. Kiupel, 2018, Davis Thompson Foundation, Illinois, USA.

## IL CAMPIONAMENTO DEI LINFONODI MANDIBOLARI: ISTRUZIONI PER L'USO

di Walter Bertazzolo



*Immagine 1 - Aspetto citologico di un linfoma T a basso grado (T-zone lymphoma) in un cane.*

Cari colleghi, uno degli errori che vengono più comunemente effettuati da clinici è il campionamento dei linfonodi mandibolari. Per due motivi principali:

- 1) spesso il clinico percepisce un apparente aumento di volume dei linfonodi di questa regione ma il materiale prelevato risulta invece essere epitelio ghiandolare salivare. Le due strutture anatomiche sono molto vicine e simili tra loro, per cui è facile scambiare una ghiandola salivare particolarmente ben palpabile per una linfadenomegalia localizzata.
- 2) Il secondo errore è estremamente comune allorché un paziente presenta linfadenomegalia generalizzata e l'unico linfonodo campionato dal clinico

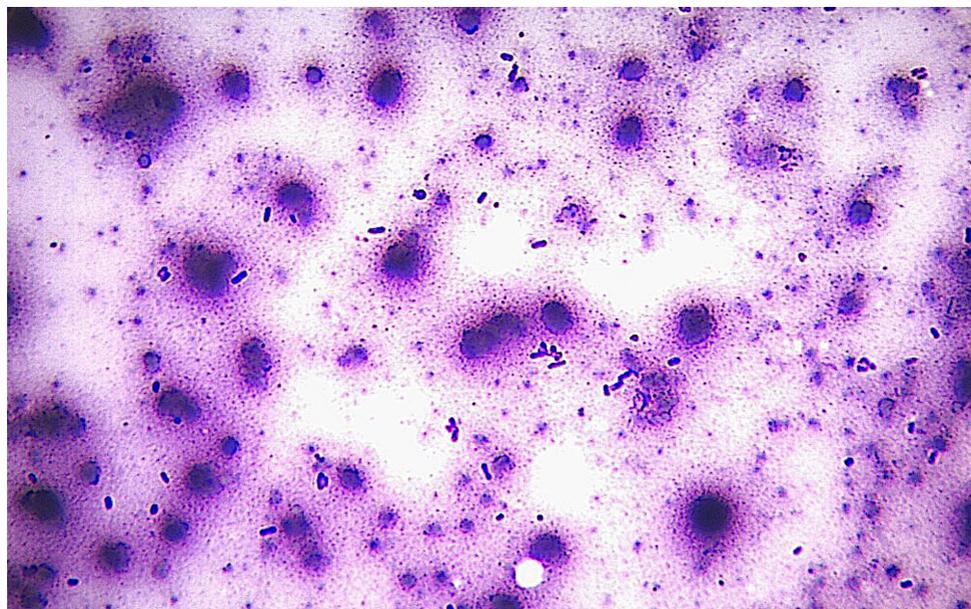
è proprio il mandibolare. Questi linfonodi possono presentare infatti delle forme di linfadenomegalia reattiva molto intense o atipiche, in grado di mimare un linfoma all'esame citologico, creando pertanto dei seri problemi interpretativi.

Per cui in ogni caso di linfadenomegalia generalizzata, i linfonodi di questa regione andrebbero evitati o comunque prelevare campioni anche dagli altri linfonodi esplorabili.

È ovvio che se l'unico linfonodo megalico dovesse essere proprio un mandibolare (come nel caso del linfoma T a basso grado delle foto a fianco), non possiamo esimerci dal campionarlo mediante ago-aspirazione.

## **COS'È LA BACTOBILIA IN CITOLOGIA?**

di Walter Bertazzolo



*Immagine 1 - Infezione batterica in esame citologico di bile di cane (Bactobilia).*

Cari Cytofans, vi mostriamo questo caso interessante per parlarvi di una condizione poco conosciuta, la “bactobilia”.

Il campione di cui vi mostriamo le immagini (vedi foto allegate sotto), è un prelievo di bile da un cane per FNA eco-guidato. Come potete notare si osservano, su fondo diffusamente granulare eosinofilo proteinaceo, numerosi batteri dalla morfologia bastoncellare, talora con evidente capsula incolore, associati ad occasionali neutrofili degenerati (non ben visibili nelle immagini). Questo quadro citologico è riferibile ad infezione batterica biliare (bactobilia).

La bactobilia è una complicanza possibile in corso di patologie epatiche, pancreatiche o gastrointestinali, causata dalla colonizzazione batterica ascendente della

colecisti e del suo contenuto biliare. In letteratura scientifica esistono due recenti pubblicazioni, a carattere retrospettivo, che valutano l'incidenza di questa patologia nel cane e nel gatto, l'utilità diagnostica della citologia del contenuto biliare, e la concordanza con i risultati dell'esame batteriologico.

Gli agenti infettivi sono stati riscontrati in circa il 30% dei casi analizzati nel cane e in circa il 22% dei casi nel gatto, il che indica come questa condizione sia tutt'altro che rara.

Sussiste una buona concordanza diagnostica tra l'esame citologico (33% di positività) e l'esame batteriologico (21% di positività), soprattutto nei pazienti che non erano sottoposti a terapia antimicrobica nelle 24 h precedenti all'esame colturale.

*Escherichia coli* (14.8%) ed *Enterococcus spp.* (6.7%) sono stati i batteri più comunemente isolati dall'esame batteriologico.

Alla luce di questi dati, sebbene siano necessari ulteriori studi per comprendere bene il significato clinico di questo rilievo, gli autori consigliano il contemporaneo utilizzo di entrambe le metodiche diagnostiche (citologia e microbiologia) nella valutazione delle patologie epatobiliari.

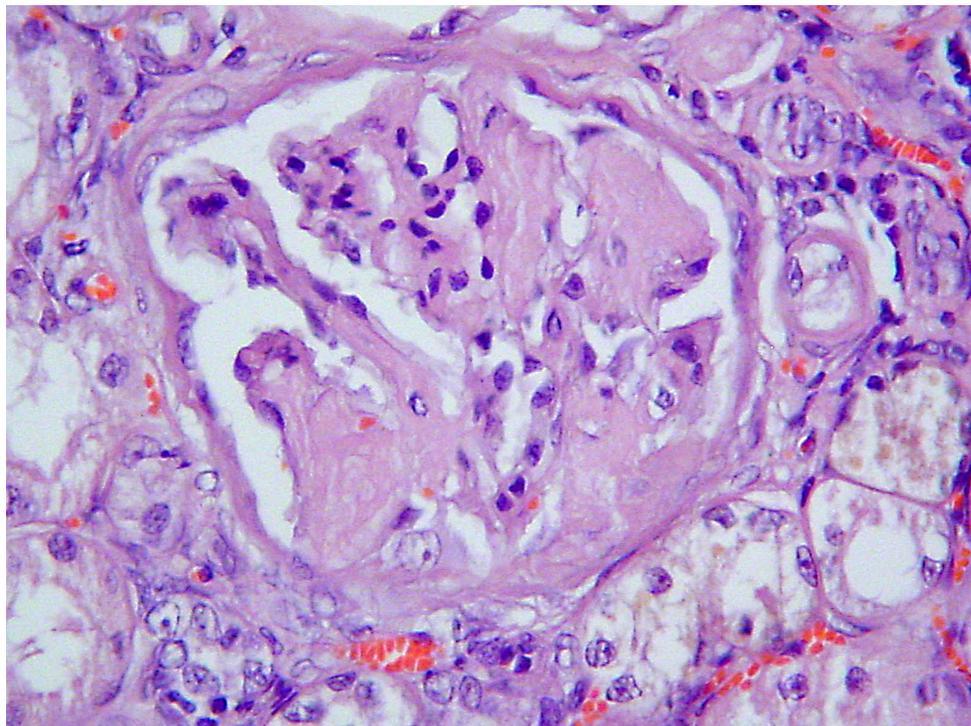
Per chi volesse approfondire l'argomento, vi invitiamo a leggere queste recenti pubblicazioni:

J Vet Intern Med, 2016 Jan-Feb Cytological Findings of 140 Bile Sample from Dogs an Cats and Associated Clinical Pathological Data.

J Am Vet Assoc., 2017 May Agreement between microscopic examination and bacterial culture of bile samples for detection of bactobilia in dogs and cats with hepatobiliary disease.

## LA BIOPSIA RENALE: COME OTTENERE INFORMAZIONI CLINICO-PATOLOGICHE A 360°

intervista a Francesco Dondi, Giliola Spattini, Luca Aresu e Silvia Benali



Al recente VetExpo di Milano, un team di nostri esperti ha presentato il nuovo servizio di biopsia renale offerto da MyLav. L'internista (Francesco Dondi), il radiologo (Giliola Spattini) e i patologi (Luca Aresu e Silvia Benali) hanno mostrato quali sono le indicazioni, le procedure e le informazioni cliniche che possono derivare dalla biopsia renale.

Se la procedura biopica è correttamente eseguita, permette di ottenere dei campioni di qualità. E' possibile allora richiedere una serie di valutazioni approfondite

sui campioni, inclusivi di colorazioni standard, colorazioni istochimiche, immunofluorescenza e microscopia elettronica. Con tutti questi accertamenti è possibile quindi fornire una diagnosi accurata della patologia renale in corso, con importanti risvolti prognostici e terapeutici.

### **Iniziamo con Francesco Dondi, al quale vorremmo chiedere innanzi tutto in quali situazioni cliniche è consigliabile il ricorso a questa procedura diagnostica?**

Francesco Dondi: l'indicazione principale per la biopsia renale, o più in generale per l'esame istopatologico del rene, attualmente è rappresentata dalle glomerulopatie proteinuriche.

La biopsia, inoltre, può essere utile anche per chiarire l'eziologia in corso di danno renale acuto (AKI) o più raramente in corso di malattia renale cronica (CKD), quando si assiste ad una progressione rapida e inattesa della patologia stessa.

In queste ultime due condizioni, tuttavia, si ricorre raramente alla biopsia renale poiché solo in pochi casi il risultato della valutazione patologica è in grado di impattare significativamente sulle terapie che vengono somministrate al paziente e sul decorso clinico della malattia.

In corso di glomerulopatia, al contrario, è fondamentale discriminare tra patologie a patogenesi immunologica che possano beneficiare o risolversi completamente con terapia immunosoppressiva e patologie di natura degenerativa/cronica (glomerulosclerosi, amiloidosi) che solitamente vengono trattate con la sola terapia standard della glomerulopatia. Tale distinzione può essere raggiunta esclusivamente attraverso la corretta analisi istopatologica di campioni di tessuto renale.

Da un punto di vista clinico un paziente candidato per la biopsia renale è quindi un soggetto proteinurico (a volte come unico segno, c.d. proteinuria asintomatica), frequentemente ipoalbuminemico o più raramente che presenta edemi periferici e versamenti cavitari trasudatizi (sindrome nefrosica).

La funzione renale può essere normale e proprio questo paziente sarà il candidato ideale per eseguire una biopsia renale, poiché più la funzione renale è compromessa maggiori sono i rischi della procedura stessa così come i rischi di ottenere un risultato poco utile al clinico.



*“Più grave è la proteinuria e migliore è la funzione renale, maggiore è l’indicazione per la biopsia renale”.*

Questa è un’ottima regola da tenere a mente e che spesso il clinico ignora tardando ad eseguire un esame fondamentale.

Tipicamente, i reni di questi pazienti presentano scarse o nulle alterazioni ecografiche. Anche questo aspetto è di notevole importanza: maggiori sono le alterazioni ecografiche (soprattutto quelle caratteristiche di CKD) minori saranno i dati diagnostici utili che potremo ottenere dalla biopsia poiché avremo di fronte campioni con grave fibrosi e lesioni che raramente o mai rispondono alla terapia immunosoppressiva.

### **Quali procedure diagnostiche sono necessarie PRIMA di eseguire la biopsia?**

Francesco Dondi: prima di pensare di eseguire una biopsia renale, il paziente deve ricevere una valutazione clinica e diagnostica collaterale completa.

Da un punto di vista clinico bisogna fare particolare attenzione alla presenza di ipertensione arteriosa, edemi e versamenti (possibile sindrome nefrosica), alla valutazione dei polsi periferici e delle caratteristiche del respiro (possibili trombosi), così come ai segni clinici specifici di possibili eziologie di glomerulopatia (es.: malattie trasmesse da vettore come Leishmaniosi, Ehrlichiosi, malattie autoimmuni, malattie infiammatorie/non infettive).

Un paziente di questo tipo deve ricevere una approfondita valutazione ecografica del parenchima renale ed in generale del cavo addominale.

La biopsia renale, non deve rappresentare una procedura da eseguire in urgenza (salvo quando la si voglia utilizzare in corso di AKI), ma il paziente deve essere adeguatamente stabilizzato.

Visto che spesso si tratta di pazienti con glomerulopatie proteinuriche e ipoalbuminemia grave, nella pratica quotidiana dobbiamo prenderci il tempo necessario a trattare le principali problematiche associate, iniziare eventualmente una terapia standard per la glomerulopatia (con dieta renale a restrizione proteica, acidi grassi poli-insaturi, inibitori del sistema renina angiotensina aldosterone, anti-ipertensivi, etc.), e portare il paziente alla biopsia in condizioni stabili.

Bisogna fare particolare attenzione alla terapia fluida (spesso abusata) sia con cristalloidi, sia con colloidali (naturali o sintetici), onde evitare sovra-idratazione del paziente e potenziale peggioramento della funzione renale.

### **Quindi quali esami di laboratorio consideri necessari prima della biopsia?**

Francesco Dondi: da un punto di vista del laboratorio la valutazione standard prevede l'esecuzione di:

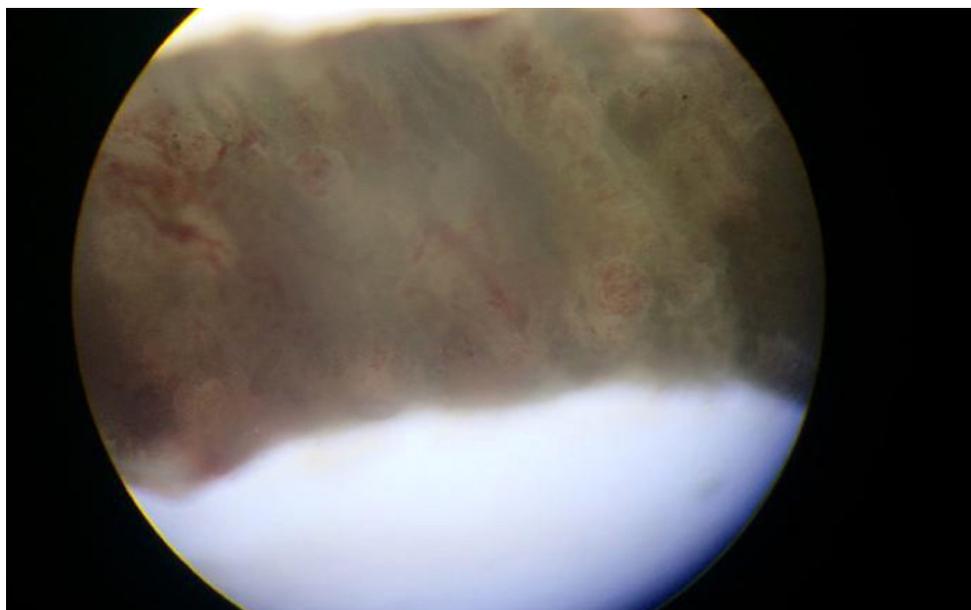
- esame emocromocitometrico.
- Profilo chimico completo.
- Profilo emostatico completo (AT, DD, Fibrinogeno).
- Esame urine con rapporto PU/CU ed eventuale proteinuria qualitativa (elettroforesi urinaria).
- Ricerca per malattie infettive o immunomediate/autoimmuni a seconda del sospetto clinico (solitamente sierologia quantitativa per *Leishmania* spp., *Ehrlichia canis*, test per *Borrelia burgdorferi*, eventuale ANA test).
- Altre ricerche eziologiche a seconda del sospetto clinico (test endocrini, etc.).

### **Hai consigli pratici per l'esecuzione della procedura?**

Francesco Dondi: la biopsia renale può essere ottenuta con vari metodi: alla cieca, ecoguidata, per via laparoscopica o laparotomica.

Tutte queste procedure richiedono l'anestesia generale e conseguentemente, vista la complessità del paziente, il supporto di un anestesista esperto. Attualmente, salvo casi particolari, la quasi totalità delle biopsie renali viene eseguita per via ecoguidata utilizzando aghi tipo Tru-Cut a scatto (es.: 16G, 18G) con scarse o nulle complicazioni, se la procedura è eseguita nel modo corretto. Solitamente, in questo modo, si prelevano 2 o 3 frammenti biotipici di circa 1 cm di lunghezza che poi vengono suddivisi o destinati tal quali alle tre principali valutazioni patologiche (istologia classica, immunofluorescenza e microscopia elettronica). Dopo l'esecuzione della biopsia il paziente deve essere monitorato ecograficamente subito dopo la procedura e ancora dopo 1 e 3 ore. Solitamente la procedura viene eseguita in day hospital in modo da poter monitorare in modo adeguato il paziente.

I campioni di tessuto, una volta raccolti, ma prima di essere fissati, possono essere osservati al microscopio ottico (50, 100 e 400X) per valutarne “l’adeguatezza” in merito alla presenza di glomeruli (vedi foto seguente).



*Immagine 1 - Campione bioptico osservato al microscopio prima della fissazione in formalina.*

Tale aspetto è molto importante onde evitare quello che può spesso accadere soprattutto ad un operatore inesperto, ovvero di fornire al patologo campioni inadeguati e quindi aver sottoposto il paziente ad una procedura inutile.

### **Quali sono le complicazioni che possono capitare? E quando è assolutamente sconsigliata?**

Francesco Dondi: le complicazioni principali della biopsia renale ecoguidate sono rappresentate dall’emorragia nel sito di prelievo, solitamente minima e a sede sottocapsulare. Altre complicazioni sono più rare e sono rappresentate da emorragie di gravità maggiore, ematuria macroscopica (solitamente è assente o microscopica

e perdura per qualche ora, max 48 ore), infarti renali e peggioramento della funzione renale.

La biopsia renale non è indicata in pazienti con:

- monorene.
- Malattia renale cronica (CKD) in stadio avanzato o terminale (es.: stadio IV IRIS CKD).
- Grave ipertensione arteriosa non in terapia.
- Alterazioni dell'emostasi.
- Infezione renale o peri-renale.
- Idronefrosi.

### **Passiamo ora la parola ai patologi esperti in patologia renale, Silvia Benali e Luca Aresu. Perché è importante una valutazione microscopica da parte di un patologo specialista in patologia renale?**

Silvia Benali e Luca Aresu: classicamente l'esecuzione di una biopsia renale e dell'esame istopatologico sono stati considerati un'indagine invasiva e poco utile, spesso non in grado di fornire diagnosi definitive e soprattutto con scarsi risvolti sulla gestione clinica del paziente. Questo perché si è sempre considerato il tessuto renale come un qualsiasi altro campione istologico a partire dall'interpretazione al microscopio ottico con la sola colorazione ematossilina-eosina che normalmente viene utilizzata nell'istologia di routine.

In realtà, così come in medicina umana, si è evidenziato recentemente che è necessario un approccio più articolato e completo, con colorazioni istochimiche speciali, l'utilizzo di tecniche diagnostiche aggiuntive, ovvero l'immunofluorescenza e la microscopia elettronica e, non da ultimo, un patologo con esperienza nella valutazione del tessuto renale e delle sue lesioni.

Negli ultimi decenni, si è visto come questo approccio "specialistico", fornisca diagnosi più accurata, identifichi patologie anche in forma lieve, ed infine fornisca informazioni utili e spendibili per l'approccio clinico (per esempio eseguire o meno una terapia immunosoppressiva in caso di glomerulo-nefrite immunomediata).

In particolare un gruppo di lavoro della WSAVA (World Small Animal Veterinary Association) ha pubblicato articoli scientifici che ribadiscono l'importanza di questo approccio fornendo le linee guida per una valutazione standardizzata delle biopsie renali nel cane.

## **Che caratteristiche deve avere il campione prelevato per valutare le lesioni presenti e raggiungere una diagnosi?**

Silvia Benali e Luca Aresu: sembra una risposta banale ma per prima cosa il campione deve essere quantitativamente e qualitativamente adeguato. Questo significa che deve includere tessuto prelevato a livello della corticale renale e deve contenere un sufficiente numero di glomeruli.

In istologia, il numero minimo per considerare diagnostico una biopsia renale è di 9-10 glomeruli, 4-5 per l'immunofluorescenza, mentre per la microscopia elettronica ne basta generalmente 1, anche se un numero più elevato può aumentare la sensibilità e specificità della diagnosi finale.

Occasionalmente, un minor numero di glomeruli può comunque permettere di raggiungere una diagnosi, e il patologo cerca di fornire almeno un sospetto diagnostico, ma come sempre capita in patologia le dimensioni dei campioni influiscono sulla correttezza della diagnosi finale.

Come già anticipato, in questo approccio specialistico, si rende necessario affiancare all'istologia altre tecniche diagnostiche, ovvero, l'esame di immunofluorescenza e la microscopia elettronica. Queste tecniche vengono svolte su tessuto conservato in medium/fissativi specifici in cui il tessuto dovrà essere incluso al momento del prelievo. È quindi essenziale essere in possesso di tali fissativi/medium quando si prevede di eseguire una biopsia renale. Tali fissativi possono essere richiesti e forniti dal laboratorio.

## **Quali colorazioni istochimiche speciali si utilizzano in istopatologia renale e a cosa servono?**

Silvia Benali e Luca Aresu: le colorazioni di routine sono 4 (PAS, Ematosilina-Eosina, Tricromica di Masson e PAMS/Jones methenamine silver) cui se ne aggiunge una quinta in caso di sospetto di amiloidosi (Rosso Congo).

La colorazione PAS è la più importante per l'analisi delle lesioni glomerulari. Si tratta di una colorazione utilizzata in istologia per la colorazione delle membrane basali e nello specifico, le membrane glomerulari e la matrice mesangiale.

L'Ematossilina-Eosina è utilizzata soprattutto per la valutazione del comparto tubulo-interstiziale ed in particolare la presenza di degenerazione/necrosi tubulare e tipizzazione dell'infiltrato infiammatorio.

La colorazione Tricromica di Masson ha una duplice utilità: in primis evidenzia l'eventuale fibrosi interstiziale e ne permette una quantificazione. In secondo luogo, può evidenziare la presenza di depositi proteici glomerulari generalmente riscontrabili in malattie glomerulari immunomediate.

La colorazione PAMS/Jones methenamine silver evidenzia la struttura glomerulare ed in particolare la presenza di alterazioni delle membrane, aree di sclerosi...

La colorazione Rosso Congo colora la sostanza amiloide e permette di confermare un eventuale sospetto di amiloidosi renale. Questa colorazione non viene generalmente eseguita di routine ma solo in caso di un sospetto di malattia da accumulo.

### **A cosa servono immunofluorescenza e microscopia elettronica?**

Silvia Benali e Luca Aresu: l'immunofluorescenza è una tecnica diagnostica utilizzata per rilevare la presenza e tipizzare anticorpi e complemento. Nello specifico nella patologia renale l'immunofluorescenza mira a ricercare frazioni di immunoglobuline e del complemento che compongono immunocomplessi a livello del glomerulo.

Ovviamente per una diagnosi definitiva di glomerulopatia immunomediata, questa tecnica va integrata con valutazione istologica e con la microscopia elettronica.

La microscopia elettronica è una tecnica che permette di valutare la presenza di lesioni ultrastrutturali che non sono normalmente valutabili alla microscopia ottica. Nello specifico quando si esamina un campione di tessuto renale è possibile esaminare ed identificare lesioni a carico di podociti, capillari glomerulari, presenza e localizzazione di depositi, emboli lipidici ecc.

Queste tecniche, utilizzate in concerto con l'esame istopatologico sopra descritto rappresentano il processo ottimale per arrivare ad una diagnosi.

### **Cosa fare quando vogliamo inviare una biopsia renale al laboratorio MyLav?**

Silvia Benali e Luca Aresu: come accennato precedentemente, al momento dell'esecuzione di una biopsia renale, l'ideale è suddividere immediatamente i campioni



biopatici tra i vari fissativi (formalina per istologia, soluzione di Michel per immunofluorescenza e glutaraldeide per microscopia elettronica).

I campioni in glutaraldeide e Michel vanno conservati a temperatura di refrigerazione (0-4°C) e conferiti al laboratorio.

Come già detto è possibile richiedere al laboratorio dei kit che contengono 3 provette con i fissativi per conservare adeguatamente i campioni di tessuto.

Per quanto riguarda la richiesta al laboratorio si rende necessario richiedere l'esame istologico della biopsia renale con "valutazione complessa", immunofluorescenza e la microscopia elettronica (se il campione è stato prelevato per tali indagini).

### **Cosa fare se l'istologia non basta ma non ho altro tessuto conservato specificatamente per l'immunofluorescenza e/o la microscopia elettronica?**

Silvia Benali e Luca Aresu: purtroppo non c'è nulla da fare per quanto riguarda l'immunofluorescenza. Infatti, per l'esecuzione dell'immunofluorescenza, il tessuto deve essere adeguatamente conservato fin dall'inizio, immergendolo in un medium (soluzione di Michel) che permette di mantenere le caratteristiche a fresco per 24-48 ore, il tempo necessario a conferirlo al laboratorio dove verrà processato e congelato per la successiva analisi. Quindi se non abbiamo agito in questo modo fin da subito non sarà possibile eseguire l'indagine di immunofluorescenza su quel campione.

Il discorso è diverso per quanto riguarda l'indagine di microscopia elettronica. Per tale tecnica è infatti possibile recuperare il campione fissato in formalina usato per l'istologia, ma è bene tenere in considerazione che la qualità delle immagini prodotte sarà più scadente e la valutazione potrebbe essere non ottimale. Inoltre una volta utilizzato il campione per la microscopia elettronica, non sarà possibile eseguire ulteriori sezioni istologiche del campione inviato.

## ESAME DEL LIQUOR CEFALORACHIDIANO: COME EVITARE ERRORI FRUSTRANTI

di Walter Bertazzolo



Immagine 1 - Citoconcentratore artigianale.

L'aspetto principale che bisogna sempre tener bene a mente, è che il LCR è un liquido a bassa concentrazione proteica (in condizioni normali essa è oltre 100 volte più bassa rispetto a quella plasmatica). Di conseguenza le cellule presenti nel LCR sono estremamente labili e fragili (tendono ovvero a lisciarsi rapidamente e con molta facilità). Saranno quindi necessarie alcune particolari precauzioni per analizzarle.

- 1) Determinazione della concentrazione proteica. Può essere eseguita anche su campione conservato in frigo/freezer e non necessita di precauzioni particolari. Non può però essere determinata mediante rifrattometro e nemmeno mediante la chimica clinica normalmente impiegata per la determinazione delle proteine sieriche/plasmatiche. Si devono usare kit diagnostici molto più sensibili (quelli ad esempio per la determinazione delle proteine urinarie), in quanto come già detto la concentrazione proteica del LCR è molto bassa.

- 
- 2) Determinazione della conta cellulare: questa informazione è estremamente importante da un punto di vista clinico, e purtroppo deve necessariamente essere eseguita dal clinico. Non può quindi essere demandata al laboratorio, in quanto il numero di cellule tende a decrescere col passare delle ore. Più la concentrazione proteica è elevata nel LCR (per esempio a causa di infiammazione), più questo effetto è ridotto. È possibile ridurre quindi il decremento della conta cellulare aggiungendo colloidi o siero autologo in quantità ben definita (es. 50uL di siero + 200 uL di LCR). Tuttavia il metodo più accurato per stabilire la reale concentrazione cellulare è quello di effettuare la conta entro 1 ora dal prelievo. La conta dovrà essere eseguita necessariamente con emocitometro (es. una camera di Burkner), metodo che richiede un po' di esperienza ed esercitazione pratica.
  - 3) Analisi citologica della componente cellulare: per stabilire che tipo di cellule sono presenti nel campione è necessario allestire un preparato citologico. Questo è lo step che spesso viene eseguito scorrettamente da parte dei clinici. Il preparato va fatto il più in fretta possibile dopo il prelievo (possibilmente entro pochi minuti) proprio per evitare il deterioramento cellulare e quindi non può essere effettuato dal laboratorio. Altra osservazione molto importante, lo striscio su vetrino non può essere eseguito come un normale striscio da altra tipologia di liquido biologico (per esempio un versamento): le cellule risulterebbero tutte lisate e non riconoscibili.

È assolutamente necessario il ricorso ad una citoconcentrazione mediante citocentrifuga (disponibile sono in centri specializzati) o ricorrendo a citoconcentratori manuali più o meno artigianali (vedi foto sopra a sinistra). Nella prossima puntata vi spiegherò come costruire un banalissimo citoconcentratore a costo prossimo a zero.

- 4) In alcuni casi può essere necessario richiedere la ricerca di agenti eziologici (es. virus del cimurro, batteri, ecc.) per cui può essere utile conservare una parte del campione per eventuali indagini microbiologiche o molecolari (es. PCR).

## COME COSTRUIRE UN CITOCENTRATORE PER LIQUOR CEFALORACHIDIANO

di Walter Bertazzolo

Tranquilli, non è una nuova edizione di Art Attack!

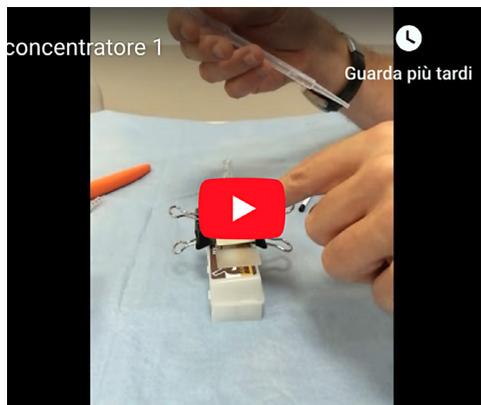
Vogliamo solo mostrarvi come preparare con pochi soldi ed in poco tempo un citocentratore per liquor cefalorachidiano (LCR) nella vostra struttura.

Non tutti possono infatti permettersi una costosa citocentrifuga e, come già spiegato nel post precedente, la citologia da LCR non può essere preparata come per gli altri fluidi biologici.

La bassa concentrazione proteica del LCR rende le cellule in esso sospese molto, molto fragili e “non possono essere toccate”. Bisogna lasciarle sedimentare sul vetrino ed asciugare, poi si possono fissare all’aria e colorare come qualsiasi altro campione citologico.

Nei due brevi video che abbiamo pubblicato sul nostro Blog vi mostriamo come procedere: in pochi minuti avrete un buon campione di LCR da analizzare.

Buon lavoro



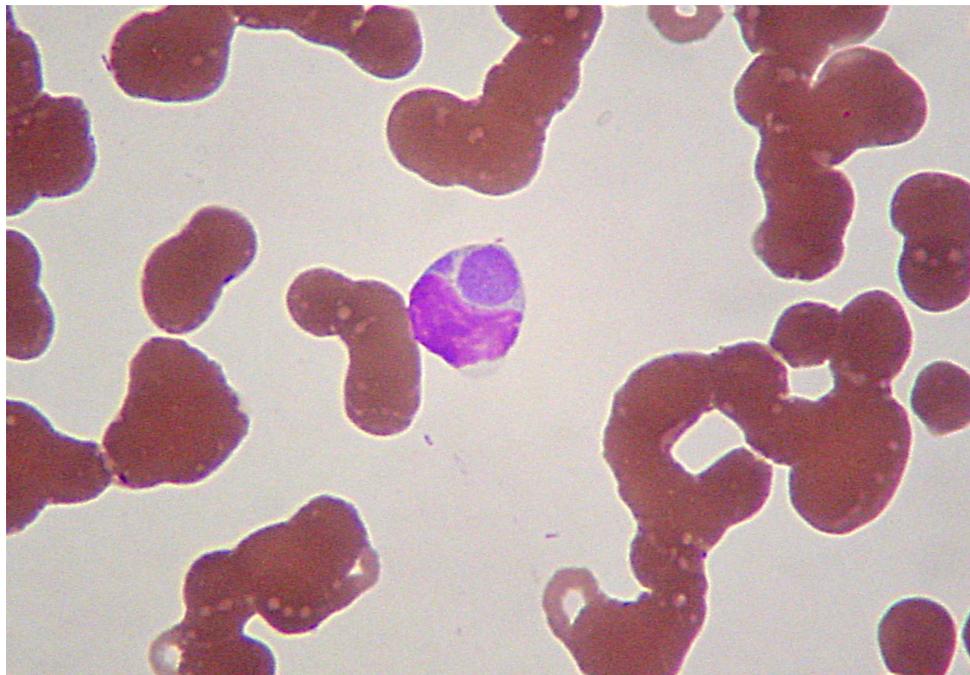
<https://youtu.be/2o6ofZdM2eM>



<https://youtu.be/WMI5MGz6Cco>

## LE MALATTIE TRASMESSE DA VETTORE: LO SCREENING MEDIANTE BIOLOGIA MOLECOLARE

di Walter Bertazzolo



*Immagine 1 - Morula di Ehrlichia canis nel citoplasma di un monocita.*

Numerosi agenti infettivi (virali, batterici, protozoari e nematodi) vengono trasmessi tramite artropodi ematofagi. Alcuni di questi agenti sono in grado di causare malattie nell'uomo e negli animali.

Queste patologie sono generalmente note come “malattie trasmesse da vettore”.

Alcune di queste patologie hanno una morbilità e mortalità molto bassa (es. Rickettsie nel cane, Micoplasmi nel gatto).

Altre hanno una patogenicità e quindi morbilità e mortalità molto superiore (es. Piroplasmosi, Ehrlichiosi e Leishmaniosi).

Per altre ancora le conoscenze in veterinaria sono limitate (es. Borreliosi).

La ricerca di questi agenti eziologici mediante biologia molecolare presenta alcuni vantaggi rispetto agli screening sierologici:

- 1) l'infezione può essere svelata anche con quantità minime di campione.
- 2) Il DNA degli agenti eziologici è molto stabile.
- 3) L'infezione può essere svelata ancor prima della comparsa di segni clinici ed in fase acuta, mentre la sierologia risulterebbe negativa.
- 4) Un risultato positivo indica che l'infezione è sicuramente in atto, mentre una positività alla sierologia potrebbe essere semplicemente legata ad una pregressa infezione ormai non più presente nell'organismo.

Per tutte queste ragioni la biologia molecolare dovrebbe accompagnare gli screening sierologici e in alcuni casi sostituirsi ad essi.

Vi alleghiamo una tabella riassuntiva di alcune patologie da vettore (in particolare da zecche) che potrebbe risultarvi utile nella pratica clinica.

### **ANAPLASMOSI (EHRlichIOSI GRANULOCITARIA)**

Agente eziologico	<i>Anaplasma phagocytophilum</i> .
Segni clinici	Letargia, Febbre, Tachipnea, Lieve linfoadenomegalia, Splenomegalia, Zoppia, Tumefazione Articolare, Dolore articolare. Talora infezioni croniche asintomatiche.
Alterazioni laboratorio	Anemia lieve non rigenerativa, Neutrofilia / Neutropenia lieve, Linfopenia / Linfocitosi, Trombocitopenia, Ipoalbuminemia moderata, Iperglobulinemia lieve.
Test diagnostici (1)	<b>Citologia: MATRICI:</b> Sangue intero, Buffy coat, Liquidi biologici, Tessuti: Morule intraneutrofiliche – bassa sensibilità diagnostica.
Test diagnostici (2)	<b>PCR*: MATRICI:</b> Sangue intero, Buffy coat, Linfonodi, Milza, Midollo osseo. Possibili portatori sani.
Test diagnostici (3)	<b>ELISA – IFI**:</b> Positività dopo 8 – 10 giorni da infezione. Persistenza anticorpale per mesi dopo infezione.

## EHRlichiosi (EHRlichiosi monocitaria canina "CME")

Agente eziologico	<i>Ehrlichia canis</i> .
Segni clinici	Letargia, Febbre, Lieve linfoadenomegalia, Splenomegalia, Petecchie, Rinorragia, Uveite, Ifema, Emorragie retiniche, Distacco retinico. Segni neurologici. Mucose pallide. Talora infezioni croniche asintomatiche.
Alterazioni laboratorio	Anemia da lieve a grave, non rigenerativa, Linfopenia / Linfocitosi, Trombocitopenia. Pancitopenia nelle infezioni croniche. Ipoalbuminemia, iperglobulinemia (frequente gammopatia policlonale; rara gammopatia monoclonale).
Test diagnostici (1)	<b>Citologia: MATRICE:</b> Sangue intero, Buffy coat, Aspirati splenici. Morule intramonocitarie – bassa sensibilità diagnostica.
Test diagnostici (2)	<b>PCR*: MATRICE:</b> Sangue intero, Buffy coat, Linfonodi, Milza (matrice preferenziale), Midollo osseo. Bassa sensibilità per infezioni croniche.
Test diagnostici (3)	<b>ELISA – IFI**:</b> Positività: infezione pregressa più che infezione attiva. Persistenza anticorpale per mesi / anni dopo infezione.

## BORRELIOSI (MALATTIA DI LYME)

Agente eziologico	<i>Borrelia burgdorferi</i> .
Segni clinici	Letargia, Febbre, Anoressia, Inappetenza, Zoppia, Tumefazione articolare / Poliartrite, Andatura rigida, (Lesioni eritematose).
Alterazioni laboratorio	Anemia, Leucocitosi, Trombocitopenia lieve.
Test diagnostici (1)	<b>Citologia: Liquido sinoviale:</b> da normale ad artrosinovite neutrofilica.
Test diagnostici (2)	<b>PCR*: MATRICE:</b> Tessuti e liquidi biologici (in particolare liquido sinoviale) potenzialmente infetti, Sangue intero, Buffy coat. Bassa sensibilità.
Test diagnostici (3)	<b>ELISA – IFI**:</b> Sieroprevalenza molto bassa in Europa. Positività dopo 4 – 6 settimane da infezione. Possibili falsi positivi per altre malattie infiammatorie ed infezioni da altre spirochete.

## BABESIOSI

Agente eziologico	<i>Babesia canis; Babesia gibsoni</i> .
Segni clinici	Letargia, febbre, anoressia, mucose pallide, emoglobinuria.
Alterazioni laboratorio	Anemia, Leucopenia, Monocitosi, Trombocitopenia.
Test diagnostici (1)	<b>Citologia: MATRICE:</b> Sangue intero, Buffy coat.
Test diagnostici (2)	<b>PCR*: MATRICE:</b> Sangue intero, Buffy coat, Milza.
Test diagnostici (3)	<b>ELISA – IFI**:</b> Negatività in condizioni acute. Positività in infezioni subacute / croniche (Possibili falsi negativi in infezioni croniche).

## RICKETTSIOSI

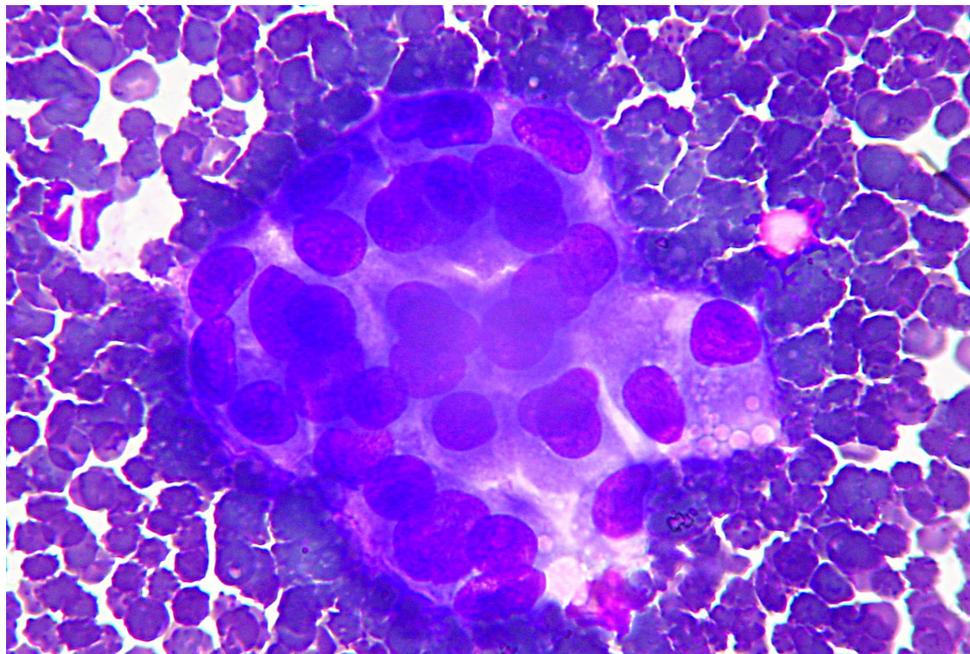
Agente eziologico	<i>Rickettsia</i> spp.
Segni clinici	Infezioni asintomatiche / Rari casi di malattia sistemica febbrile, mialgia, zoppia.
Alterazioni laboratorio	Trombocitopenia.
Test diagnostici (1)	<b>PCR*: MATRICE:</b> Sangue intero, Buffy coat.
Test diagnostici (2)	<b>ELISA – IFI**:</b> Sieroprevalenza molto elevata in Europa (solitamente infezioni / esposizioni asintomatiche). Cross reattività tra varie specie di Rickettsia.

\* PCR: Polymerase Chain Reaction (Biologia molecolare)

\*\* IFI: Immunofluorescenza indiretta

## GLI AGENTI TRASMESSI DA VETTORE E I VERSAMENTI PERICARDICI NEL CANE: QUALE RUOLO EZIOPATOGENETICO?

di Walter Bertazzolo



*Immagine 1 - Piccolo ammasso di cellule mesoteliali su fondo ematico abbondante.*

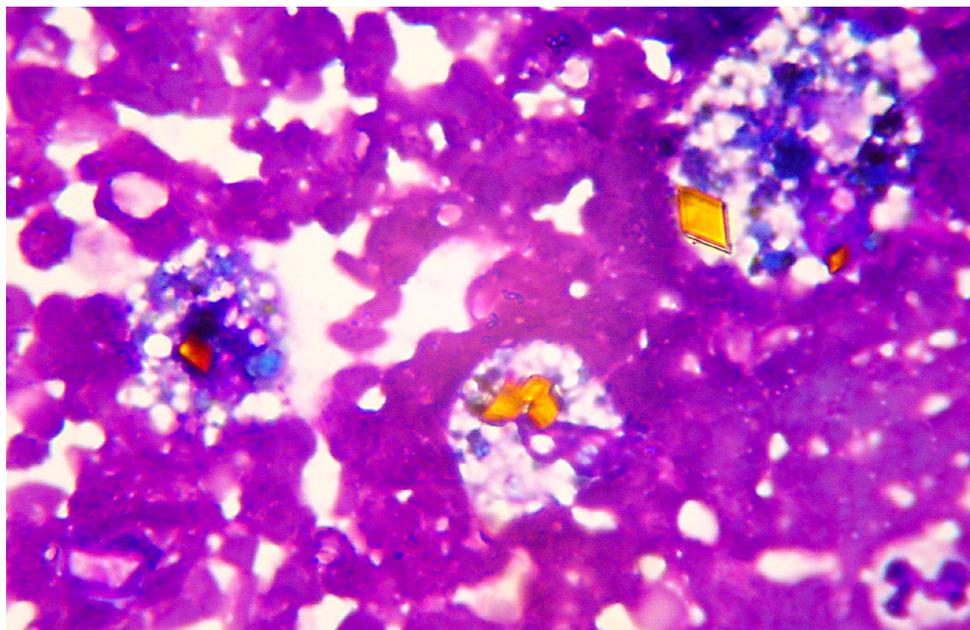
Molti di noi avranno avuto modo di imbattersi in pazienti canini con versamento pericardico, solitamente di aspetto emorragico.

Mentre la diagnosi clinica è relativamente semplice, essendo basata sui rilievi dell'esame fisico, sulla diagnostica per immagini e sulla raccolta ed esame del versamento, non altrettanto si può dire sulla definizione della causa sottostante.

La maggior parte dei versamenti pericardici del cane è infatti secondaria a neoplasie (es. chemodectomi della base cardiaca, emangiosarcoma dell'auricola,

mesoteliomi pericardici, ecc.) o a processi infiammatori ad eziologia sconosciuta (pericarditi idiopatiche).

Da un lato le neoplasie non sono semplici da identificare, in quanto richiedono una biopsia chirurgica o un esame citologico mirato; dall'altro l'esame citologico del versamento mostra regolarmente rilievi aspecifici non particolarmente utili a definirne l'eziologia sottostante: presenza di non rari macrofagi/emosiderofagi e cellule mesoteliali su fondo ematico (vedi foto in basso).



*Immagine 2 - su fondo ematico si rilevano alcuni macrofagi/emosiderofagi, contenenti emosiderina (in blu) e cristalli color oro di ematoidina.*

Come per l'uomo, anche nel cane sono stati presi in considerazione gli agenti infettivi, quali possibili responsabili delle infiammazioni croniche delle pericarditi idiopatiche.

Non ci sono studi tuttavia che hanno dimostrato una consistente associazione tra infezioni virali o batteriche e la pericardite idiopatica, se non sporadici case report.

Un recente studio ha cercato di valutare l'associazione tra il versamento pericardico e la presenza di possibili agenti patogeni trasmessi da vettore (vector borne pathogens - VBP).

Su 68 cani con effusione pericardica, 16 (23,5%) presentavano una positività a PCR su sangue e/o versamento per uno dei seguenti agenti infettivi: Leishmania, Babesia canis o B. gibsoni, Hepatozoon canis, Anaplasma platys.

La frequenza della positività era significativamente superiore tra i cani con versamento rispetto al gruppo di controllo, ma non c'erano invece differenze significative tra i cani con versamento associato a neoplasia e versamento idiopatico.

Gli autori pertanto sottolineano il possibile ruolo patogeno/predisponente di alcuni VBP nel determinare vasculite, angiogenesi, infiltrazione con parassiti (es. amastigoti di Leishmania) e cellule infiammatorie, miocardite e disfunzione cardiaca.

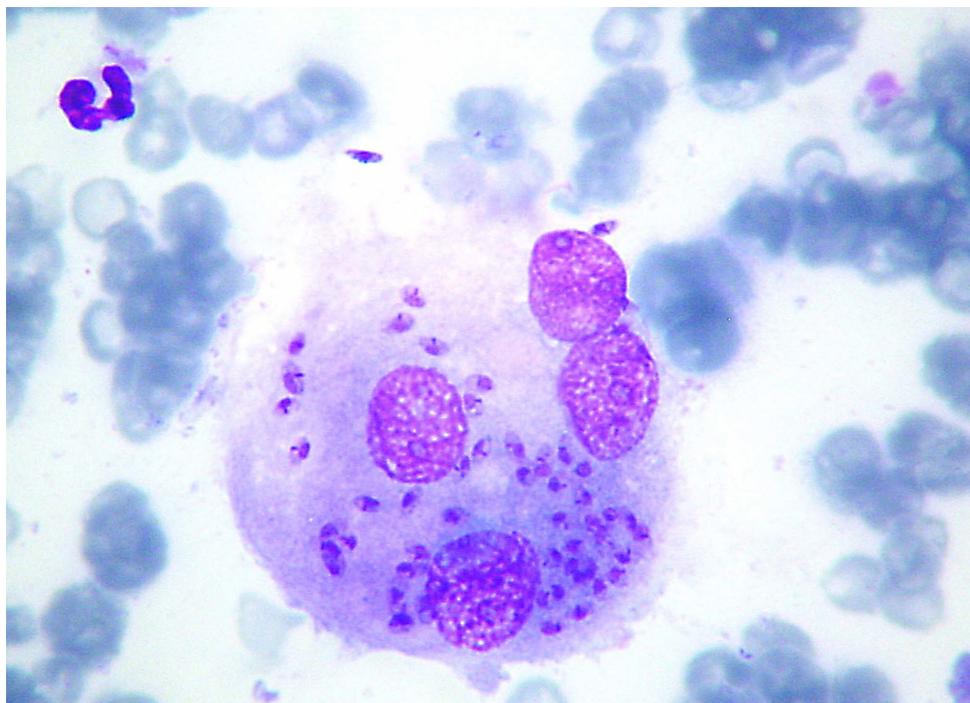
Sebbene i risultati del presente studio siano da considerarsi solo preliminari visto il ridotto numero di casi arruolati, alcuni VBP dovrebbero venir considerati tra le possibili cause scatenanti o comunque potenzialmente predisponenti. I cani con versamento pericardico dovrebbero quindi essere attentamente indagati non solo per la ricerca di neoplasie cardiache/pericardiche e della base cardiaca, ma anche per sottostanti possibili infezioni croniche e sub-cliniche.

Tratto da:

*Tabar et al. (2018) PCR evaluation of selected vector-borne pathogens in dogs with pericardial effusion. Journal of Small Animal Practice; 59: 248-252*

## **SIEROLOGIA PER LEISHMANIA: PERCHÉ L'ELISA PUÒ ESSERE UNA VALIDA ALTERNATIVA ALL'IFI**

di Walter Bertazzolo



*Immagine 1 - Numerosi amastigoti di Leishmania infantum nel citoplasma di macrofagi.*

L'immuno-fluorescenza indiretta (IFI) è storicamente considerato come il test di screening d'elezione per la leishmaniosi canina. Negli ultimi anni si sono tuttavia sempre più diffusi test basati sulla tecnologia ELISA, sia su dispositivi "rapidi" ad uso ambulatoriale che mediante kit che permettono la valutazione anche di un titolo quantitativo. Diversi studi hanno rilevato come le due metodiche sierologiche IFI ed ELISA presentino efficienza diagnostica (sensibilità e specificità) paragonabile.

Tuttavia le tecniche ELISA hanno indubbiamente dei notevoli vantaggi pratici rispetto a quelle IFI, che potremmo riassumere nei successivi punti:

1. **Facilità di esecuzione:** sicuramente i test rapidi e l'ELISA quantitativa realizzata mediante analizzatori da laboratorio sono molto meno indaginosi dell'IFI, che richiede purtroppo una consistente fase manuale (diluizioni, lettura al microscopio da parte di un operatore addestrato, ecc.). Inoltre il titolo ELISA misurato attraverso lettori ottici specifici fornisce un titolo praticamente quantitativo lineare, mentre il titolo IFI è semiquantitativo.
2. **Ripetibilità:** l'IFI è poco ripetibile, a causa della possibile variabilità di composizione dei kit e della possibile differenza di interpretazione dell'operatore. In tal senso, è risaputo che si devono considerare come clinicamente rilevanti solo variazioni di almeno 4 multipli di titolo per poter essere significative tra un test ed un altro (es. una variazione da 1:80 a 1:640 è significativa, mentre una da 1:80 a 1:160 o 1:320 è da considerarsi sovrapponibile, proprio per la notevole imprecisione del metodo).
3. **Cross reattività con altre infezioni da vettore:** sia ELISA che IFI possono condurre a falsi positivi in pazienti infetti con *Ehrlichia canis*, *Trypanosoma cruzi* e altre sottospecie di *Leishmania*. Fortunatamente, ad eccezione di *E. canis*, questi parassiti non sono segnalati in Italia. In ogni caso, anche in termini di specificità analitica non ci sono differenze importanti tra i due metodi sierologici. Lo stesso dicasi in caso di animali vaccinati con i recenti prodotti immunizzanti anti-*Leishmania*: anche per questi pazienti è normale aspettarsi un test positivo sia mediante IFI che mediante ELISA.
4. **Valutazione semiquantitativa:** fino a qualche anno fa, il grande vantaggio dell'IFI rispetto all'ELISA, era legato alla misurazione del titolo, non possibile con i test rapidi ambulatoriali, che possono solo dare un risultato negativo o positivo. Da alcuni anni si sono invece diffusi nuovi kit ELISA quantitativi che con appositi lettori da laboratorio possono fornire un titolo che ha validità sovrapponibile all'IFI. Questi strumenti hanno quindi anche permesso di superare la "soggettività" della lettura dell'IFI, che è ovviamente operatore dipendente. Da qualche anno anche il laboratorio La Vallonea può fornire un titolo ELISA quantitativo paragonabile al titolo IFI.



5. **Efficienza diagnostica:** in alcuni recenti studi l'ELISA quantitativa si è dimostrata paragonabile se non superiore all'IFI in termini di accuratezza diagnostica complessiva (de Castro-Ferreira et al 2007; Rodriguez-Cortes et al 2010/2013; Solano-Gallego et al 2014). Inoltre la siero-conversione rivelata mediante ELISA quantitativa è più precoce rispetto a IFI in corso di infezione indotta e monitorata in ambito sperimentale (Rodriguez-Cortes et al 2010).

Siamo quindi così certi che l'IFI sia tutt'oggi il metodo di elezione negli screening sierologici per Leishmania? Io non ne sono più così sicuro. E voi?

Ecco perché d'ora in avanti consiglierò l'ELISA in luogo dell'IFI.

#### Bibliografia:

de Castro-Ferreira et al (2007) Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animal presenting different clinical manifestation. *Vet Parasitol* 146: 235-341

Rodriguez-Cortes et al (2010) Leishmania infection: laboratory diagnosing in the absence of a "gold-standard". *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 82: 251-256.

Rodriguez-Cortes et al (2013) Performance of commercially available serological diagnostic tests to detect *Leishmania infantum* infection on experimentally infected dogs. *Vet Parasitol* 191: 363-366.

Solano-Gallego et al (2014) Serological diagnosis of canine leishmaniasis: comparison of three commercially available ELISA tests (LeishScan, ID Screen and Leishmania 96), a rapid test (Speed Leish K) and an in-house IFAT. *Parasite & Vectors* 7: 111.

Paltrinieri et al (2016) Laboratory methods for diagnosing and monitoring canine leishmaniasis.

## PERITONITE INFETTIVA FELINA: LE RISPOSTE DELL'ESPERTO ALLE DOMANDE PIÙ COMUNI

intervista al Prof. Nicola De Caro



Cari colleghi, la FIP è senz'altro una delle patologie feline più comuni, intriganti e difficili da gestire, a causa delle numerose sfaccettature cliniche e della difficoltà diagnostica. Abbiamo chiesto al nostro esperto di settore, il Prof. Nicola Decaro, di rispondere ad alcune delle domande che più frequentemente ci vengono poste da voi colleghi:

**1) Gli esami ematobiochimici di base sono ancora utili per emettere una diagnosi di sospetto? È cambiato qualcosa negli ultimi anni?**



In corso di FIP si osservano alcune alterazioni del quadro ematobiochimico, che non sono chiaramente indicative della malattia, ma sono utili per emettere una diagnosi di sospetto o, per lo meno, per considerare questa patologia in sede di diagnosi differenziale. L'80% dei gatti con FIP mostra una lieve anemia, mentre, per quanto riguarda i globuli bianchi, possono essere presenti quadri di leucopenia (numero di leucociti  $< 2 \times 10^9/L$ ) oppure di leucocitosi, con linfopenia e neutrofilia. Alcuni soggetti possono presentare un lieve aumento degli enzimi epatici e, soprattutto, della bilirubinemia, mentre il grave quadro infiammatorio porta all'aumento notevole delle proteine di fase acuta, quali la sieroamiloide A (SAA). Un'altra proteina che in corso di FIP registra un considerevole aumento è la glicoproteina acida alfa1, ma attualmente non esistono in commercio, almeno in Italia, test per la routinaria determinazione di questa proteina. Tuttavia, l'elemento che maggiormente può fornire un'indicazione diagnostica è rappresentato dal protidogramma, il quale è quasi sempre caratterizzato da ipergammaglobulinemia (89% dei casi), spesso accompagnato da ipoalbuminemia (64,5%) e marcata alterazione del rapporto albumine/globuline ( $< 0,8$  nell'84,7%).

## **2) La sierologia è davvero così inutile? Possiamo comunque trarre qualche vantaggio dalla titolazione anticorpale?**

Dal punto di vista antigenico e quindi immunologico, il coronavirus responsabile delle forme enteriche (FECV) e quello associato alla comparsa della peritonite infettiva felina (FIPV) sono del tutto indistinguibili, motivo per il quale non esiste un test sierologico in grado di ricercare specificatamente gli anticorpi per FIPV. Infatti, la presenza nel siero di anticorpi per coronavirus felino può essere anche dovuta ad un'infezione enterica, spesso pregressa, che non ha alcuna implicazione per lo stato di salute dell'animale. La ricerca degli anticorpi nel siero può, tuttavia, avere un senso se associata ad una titolazione degli stessi, in quanto FIPV, causando un'infezione sistemica, determina una iperproduzione di anticorpi (responsabile della stessa ipergammaglobulinemia osservabile nel protidogramma) rispetto ad una banale infezione sostenuta da FECV, che resta confinata al tratto gastroenterico. Titoli anticorpali superiori a 1:800/1:1600 sono altamente indicativi di FIP, ma vanno considerati sempre con cautela. In un'epoca in cui non esisteva la biologia molecolare, per cui la sierologia era comunemente utilizzata per la diagnosi di FIP, Niels Pedersen, uno dei massimi esperti mondiali della patologia, soleva dire:

“Muoiono più gatti a causa dei test diagnostici che della malattia vera e propria”, con ciò intendendo che la sbagliata interpretazione della sierologia porta alla inevitabile eutanasia dei gatti a causa dell’esito invariabilmente fatale della FIP.

### **3) È utile la valutazione sierologica su versamento in caso di sospetta FIP? Quale la sensibilità e la specificità di questa tecnica diagnostica applicata su questa matrice?**

Come per la sierologia, la presenza di anticorpi per coronavirus felino nel versamento pleurico o peritoneale, non esprime una diagnosi di certezza per FIP. Tuttavia, il rilievo di elevati titoli anticorpali ( $>1:800/1:1600$ ) nei versamenti cavitari è da considerarsi altamente indicativo di FIP. Infatti, i versamenti in cavità toracica, pleurica e addominale si caratterizzano come essudati (contenuto proteico superiore a 35 g/L) e gran parte del contenuto proteico è costituito proprio da gammaglobuline (gli anticorpi). Anche in questo caso, tuttavia, i risultati della titolazione anticorpale devono essere accuratamente interpretati alla luce della sintomatologia clinica e degli esami ematobiochimici, in particolare del protidogramma. Inoltre, sono frequenti anche i falsi negativi, cioè campioni di versamento prelevati da gatti con FIP accertata, ma con bassi titoli anticorpali per coronavirus o addirittura con anticorpi totalmente assenti. Questa situazione, che è osservabile fino al 10% dei gatti affetti da FIP, è stata attribuita alla formazione di immunocomplessi (complessi antigene-anticorpo) a seguito del sequestro degli anticorpi da parte del virus presente nei versamenti. Pertanto, la ricerca degli anticorpi per coronavirus per la diagnosi di FIP è caratterizzata in generale da basse sensibilità e specificità, ma quest’ultima migliora in maniera significativa se fissiamo come cut-off un titolo anticorpale  $>1:800$ . Un ulteriore limite è rappresentato dal fatto che questa metodica non può essere utilizzata in corso di FIP secca o non effusiva, a causa dell’assenza di versamenti cavitari.

### **4) Quali PCR possono essere impiegate in corso di sospetta FIP e su quali matrici? Quale la PCR più indicata per cercare di ottenere una diagnosi precisa?**

Nonostante negli ultimi decenni la biologia molecolare abbia dato un enorme impulso alla diagnosi della maggior parte delle malattie infettive dell’uomo e degli animali, non esiste, allo stato attuale, un test molecolare in grado di discriminare



tra virus enterico (FECV) e peritonitico (FIPV) con assoluta certezza. Solo ultimamente sono stati identificati, nel genoma di FIPV, alcuni marker genetici (mutazioni puntiformi) che potrebbero essere sfruttati in futuro per la messa a punto di test PCR maggiormente affidabili. Al momento, pertanto, la diagnosi molecolare di FIP fa riferimento esclusivamente alla diversa distribuzione che i due virus, FECV e FIPV, hanno nei diversi tessuti: FECV resta, in genere, confinato alla mucosa intestinale, mentre FIPV diffonde in tutto l'organismo all'interno dei monociti/macrofagi. Pertanto, la presenza dell'RNA del coronavirus felino negli organi interni (post-mortem) e nei versamenti cavitari o nei prelievi bioptici (intra-vitam) può essere considerata come altamente indicativa di FIP, soprattutto se, anziché una PCR tradizionale, si utilizza la real-time PCR, la quale, essendo un test anche quantitativo, fornisce una stima del titolo virale presente nel campione. Assolutamente da evitare è la ricerca dell'RNA virale nel sangue, sia perché la viremia in corso di FIP è incostante (rischio di falsi negativi), sia perché anche il virus enterico può causare una viremia transitoria (rischio di falsi positivi).

#### **5) Ha senso la PCR su versamento in corso di FIP effusiva? Se sì, quale PCR?**

La PCR su versamento è molto utilizzata oggi per la diagnosi di FIP effusiva, poiché la matrice è facilmente prelevabile ed il test è ormai disponibile in molti laboratori. La real-time PCR possiede performance superiori rispetto alla PCR tradizionale, perché è più sensibile e fornisce anche una titolazione dell'RNA virale presente nelle effusioni. Anche questa metodica, tuttavia, può presentare problemi di specificità e sensibilità, legati alla possibile (ma rara) presenza dell'RNA di FECV per diffusione passiva dal sangue durante la fugace fase viremica (rischio di falsi positivi) ed alla presenza nella matrice di sostanze che inibiscono la reazione di PCR (rischio di falsi negativi). Se si ha a disposizione un campione di versamento, le maggiori chance per avere una diagnosi di FIP si ottengono combinando la titolazione degli anticorpi mediante test sierologico e la ricerca dell'RNA virale mediante PCR o real-time PCR.

#### **6) Potrebbe aver senso l'immunocitochimica sui versamenti? Quali i pro ed i contro?**

L'immunocitochimica sui versamenti è considerata un test di elezione per la diagnosi di FIP, in quanto tale metodica, grazie all'utilizzo di anticorpi marcati, mette

in evidenza la presenza degli antigeni virali all'interno dei macrofagi infetti, escludendo pertanto un eventuale (anche se raro) trasporto passivo del virus enterico dal sangue, che potrebbe essere rilevato in PCR. La specificità del test è quindi molto elevata, ma si possono verificare falsi negativi (problemi di sensibilità) dovuti alla presenza di un basso numero di cellule nell'effusione (effusioni paucicellulari) o da una bassa qualità del campione analizzato (es. cellule non conservate nel campione).

### **7) Quali accorgimenti dovrebbero essere messi in atto prima di introdurre un nuovo gatto in un ambiente domestico?**

La FIP non è una malattia direttamente contagiosa: FIPV non si trasmette dai gatti malati a quelli sani, probabilmente perché, una volta che il virus enterico si è trasformato in virus altamente patogeno, quest'ultimo non replica o, al massimo, replica a bassissimo titolo nella mucosa intestinale per cui l'escrezione fecale è nulla o quasi. A circolare tra i gatti è FECV che può essere responsabile di infezioni persistenti e ricorrenti, le quali sono alla base dell'insorgenza di ceppi FIPV. Pertanto, per evitare la comparsa della FIP bisognerebbe introdurre in ambiente domestico solo gatti negativi per coronavirus (FECV) nelle feci. L'obiettivo finale dovrebbe essere la costituzione di colonie feline coronavirus free. Tale situazione non è però facilmente realizzabile, considerata l'elevata circolazione del virus nella popolazione felina, legata alla frequenza di infezioni persistenti e ricorrenti.

### **8) Ha senso ed è utile la PCR per coronavirus sulle feci?**

La PCR per coronavirus sulle feci dei gatti non deve essere utilizzata per la diagnosi di FIP sia perché non esistono test in grado di differenziare FECV da FIPV sia perché l'escrezione di FIPV nelle feci è incostante e comunque a titoli molto bassi che potrebbero non essere rilevabili neppure in PCR. La PCR sulle feci ha senso solo se utilizzata per accertare la negatività per coronavirus di gatti che devono essere introdotti in ambiente indenne. Un altro impiego utile della PCR e, soprattutto, della real-time PCR si realizza nell'attuazione di piani di risanamento delle colonie feline per FECV, i quali consistono nell'identificazione degli high shedders, cioè dei soggetti che eliminano elevate quantità di virus mediante le feci, perpetuando in tal modo la persistenza dell'infezione nella colonia. Tali soggetti dovrebbero esse-



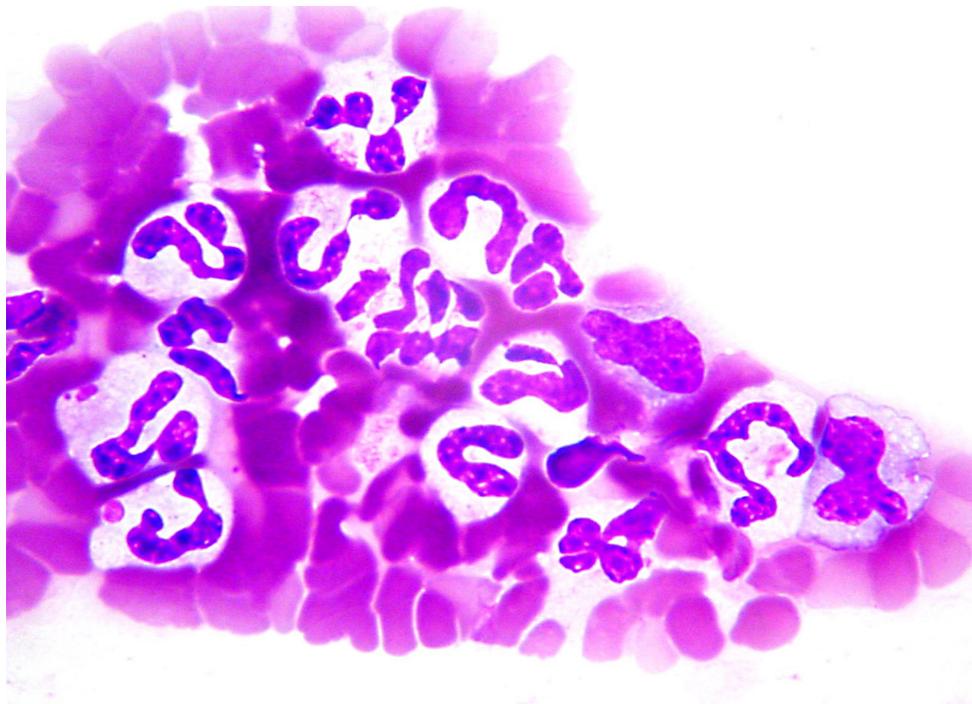
re allontanati dagli allevamenti e dalle colonie mediante affidamento in adozione. Come già detto, però, la creazione di colonie feline coronavirus free è abbastanza complicata perché, a causa dell'escrezione intermittente del virus, alcuni soggetti infetti potrebbero risultare negativi ad uno o più test PCR consecutivi.

### **9) Alla fine, la diagnosi definitiva è ancora istopatologica ed immunoistochimica?**

Nonostante i progressi della biologia molecolare ed il recente sviluppo di tecniche diagnostiche innovative per la possibile discriminazione tra FIPV e FECV, la diagnosi di FIP, specie della forma secca, presenta ancora punti di debolezza. Ancora oggi, i test gold standard per questa patologia sono rappresentati dagli esami istopatologici ed immunoistochimici, che devono essere effettuati su prelievi bioptici (intra-vitam) o su frammenti tissutali (post-mortem). Questi esami permettono di apprezzare il grave quadro istopatologico associato a FIP, con presenza di infiammazione fibrinosa e lesioni di tipo piogranulomatoso negli organi interni (vedi foto in alto, reni con piogranulomi multipli). Con l'immunoistochimica, è infine possibile accertare la presenza degli antigeni virali all'interno dei macrofagi tissutali.

## TEST PARVOVIRUS CANINO E CIMURRO

di Nicola Decaro



*Immagine 1 – Corpi inclusi intra-citoplasmatici eosinofili del cimurro nei leucociti (Foto W. Bertazzolo).*

### **Virus vaccinali e di campo nel cane: possiamo distinguerli?**

Nella pratica clinica può accadere di ricevere in visita un cane, specie cucciolo, con sintomi clinici sovrapponibili ad una malattia virale per la quale era stato vaccinato alcuni giorni prima. Nel caso della parvovirosi è abbastanza frequente che cuccioli vaccinati di recente tornino in visita con sintomi di gastroenterite emorragica, mentre più sporadicamente si osserva la comparsa di una forma neurologica dopo la vaccinazione per cimurro.



Pur nella consapevolezza che i vaccini utilizzati nel cane sono sicuri, per cui non si osserva, in genere, una reversione di virulenza dei ceppi vaccinali, si pone comunque un problema diagnostico, in quanto i vaccini per la profilassi delle principali malattie ad eziologia virale del cane (parvovirosi, cimurro ed epatite infettiva) sono allestiti con ceppi vivi attenuati, in grado di replicare nell'organismo dopo l'inoculazione, di causare viremia e di essere escreti per un periodo di tempo variabile a seconda del ceppo vaccinale.

Nel caso della parvovirosi, per esempio, l'escrezione con le feci del virus vaccinale, determinata mediante real-time PCR (PCR quantitativa), può avvenire in maniera continuativa anche per 3 settimane dopo la vaccinazione, mentre per il cimurro, pur non esistendo studi approfonditi, si ritiene che l'escrezione del virus vaccinale sia saltuaria e di minore durata.

Per quanto riguarda, invece, l'epatite infettiva del cane, il problema non si pone, in quanto la vaccinazione è effettuata con un ceppo di adenovirus del cane tipo 2, l'agente della laringotracheite infettiva del cane, oggi considerato uno dei tanti responsabili della malattia infettiva respiratoria del cane (la vecchia tosse dei canili).

In presenza di segni clinici comparsi nei giorni successivi alla vaccinazione e di positività diagnostica per parvovirus o virus del cimurro, si rende pertanto necessaria una **discriminazione tra virus vaccinale e virus di campo**, per comprendere se la positività sia dovuta alla presenza nel campione clinico del virus contenuto nel vaccino oppure del virus patogeno.

Questa discriminazione, in passato impossibile o per lo meno molto laboriosa, è oggi resa possibile dalle nuove tecniche di biologia molecolare, che, sfruttando le differenze genetiche esistenti tra questi virus, utilizza oligonucleotidi (primer e sonde) specifici per i virus vaccinali e per quelli di campo.

L'identificazione del ceppo è effettuata per il **parvovirus** del cane mediante alcuni test real-time PCR con sonde "minor groove binder" (MGB) marcate con diversi fluorofori ed in grado di rilevare anche mutazioni singole nel genoma virale.

Nel caso del **cimurro**, invece, è utilizzata una metodica di seminested PCR sul gene della emoagglutinina, la quale produce amplificati di dimensione diversa a seconda del genotipo di appartenenza del ceppo, tenendo presente che i vaccini attualmente in commercio sono allestiti con stipiti del lineaggio America-1 (non più circolante nella popolazione canina).

Le matrici utilizzabili per l'esecuzione di questi test sono:

**Parvovirosi:** feci (senza particolari accorgimenti per il trasporto e conservazione)

**Cimurro:** in fase acuta/sub-acuta le matrici utilizzabili sono il sangue, le urine o i tamponi da apparato respiratorio o oculari

In fase cronica e con coinvolgimento neurologico, si possono usare le urine o il liquor cefalorachidiano.

### Approfondimenti bibliografici

Decaro N, Buonavoglia C. Canine parvovirus - a review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c. *Vet Microbiol.* 2012 Feb 24;155(1):1-12.

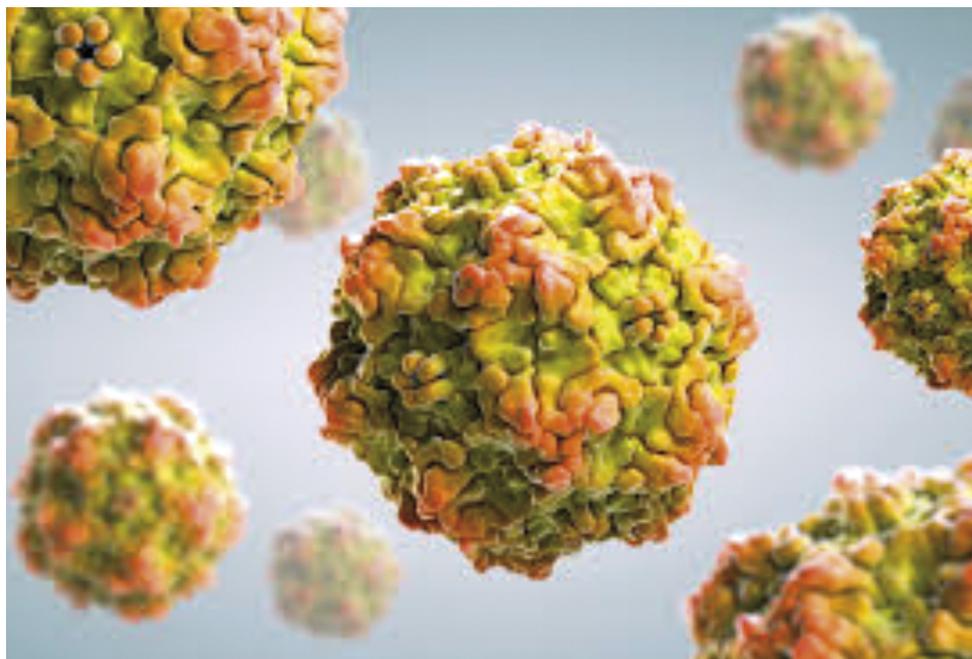
Decaro N, Desario C, Elia G, Campolo M, Lorusso A, Mari V, Martella V, Buonavoglia C. Occurrence of severe gastroenteritis in pups after canine parvovirus vaccine administration: a clinical and laboratory diagnostic dilemma. *Vaccine.* 2007 Jan 26;25(7):1161-6.

Martella V, Elia G, Buonavoglia C. Canine distemper virus. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2008 Jul;38(4):787-97, vii-viii.

Martella V, Elia G, Lucente MS, Decaro N, Lorusso E, Banyai K, Blixenkron-Møller M, Lan NT, Yamaguchi R, Cirone F, Carmichael LE, Buonavoglia C. Genotyping canine distemper virus (CDV) by a hemi-nested multiplex PCR provides a rapid approach for investigation of CDV outbreaks. *Vet Microbiol.* 2007 May 16;122(1-2):32-42.

## **LA DETERMINAZIONE DEGLI ANTICORPI PROTETTIVI: RISPONDE L'ESPERTO**

Intervista al Prof. Nicola Decaro



Cari colleghi, recentemente sono stati sviluppati metodi diagnostici per la determinazione del titolo anticorpale contro le comuni malattie infettive canine e feline. Sulla base di tali titoli protettivi, il clinico può decidere se vaccinare o meno il paziente in esame.

Il nostro laboratorio vi offre questo servizio e abbiamo quindi chiesto al nostro consulente in microbiologia e malattie infettive, il Prof. Nicola Decaro, di chiarirci le idee riguardo a tali indagini. In allegato potete trovare un PDF liberamente scaricabile con alcune domande e risposte sull'argomento, buona lettura.

## I TEST PER LA RICERCA DI ANTICORPI VACCINALI PROTETTIVI

### **1) In cosa consistono esattamente i kit per la determinazione degli anticorpi vaccinali?**

I kit per la determinazione degli anticorpi vaccinali sono test immunoenzimatici su base solida, basati sulla tecnologia ELISA, che possono essere utilizzati per verificare la necessità o meno di sottoporre cani e gatti ai richiami periodici (annuali o triennali a seconda dell'agente patogeno e del tipo di vaccino). La presenza degli anticorpi è svelata da una reazione colorimetrica, su base enzimatica, la cui intensità, confrontata con una scala di riferimento, fornisce una stima approssimativa del titolo anticorpale. In commercio esistono kit per la determinazione degli anticorpi per le principali malattie infettive ad eziologia virale del cane (parvovirus, cimurro, epatite infettiva) e del gatto (panleucopenia, rinotracheite infettiva e calicivirus).

### **2) Sono da considerarsi accurati? Quale è il “Gold Standard” per la determinazione degli anticorpi vaccinali?**

Questi kit, pur essendo affidabili, sono sicuramente meno accurati rispetto ai test sierologici tradizionali, come la virus-neutralizzazione (VN), che rappresenta il gold standard per la titolazione anticorpale. Il test VN rileva gli anticorpi neutralizzanti, che sono in genere quelli realmente protettivi, in quanto neutralizzano gli agenti virali, impedendone l'ingresso nelle cellule e bloccando l'infezione nelle sue prime fasi. Tuttavia, il test VN è complicato da eseguire, poiché richiede la disponibilità di cellule sensibili e di virus titolati, nonché un “know-how” che solo i laboratori di ricerca possiedono. Inoltre, la lettura del test VN richiede un tempo di circa 5 giorni, necessario perché il virus, in assenza di anticorpi specifici nel siero testato, possa replicare nelle cellule infette e determinare la comparsa di effetto citopatico. Solo nel caso dei parvovirus di cane e gatto, che hanno uno scarso effetto citopatico ma proprietà emoagglutinanti, si utilizza come test di laboratorio (tranne che per motivi di ricerca) la inibizione dell'emoagglutinazione (HI). Questo test è più rapido (circa 3 ore), ma, esattamente come i kit commerciali, rileva tutti gli anticorpi, non solo quindi quelli neutralizzanti.

### **3) Questi kit possono indirettamente fare diagnosi anche di “malattia”, oppure servono solo a valutare l’immunità protettiva dei vaccini?**

I kit commerciali, come tutti i test sierologici, non devono essere utilizzati per la diagnosi di malattia, in quanto, almeno per gli agenti patogeni considerati da tali test, durante la fase clinicamente manifesta dell’infezione, il sistema immunitario non ha ancora avuto il tempo di produrre un discreto titolo anticorpale, per cui il test potrebbe risultare negativo pur in presenza del patogeno. Inoltre, nessun test sierologico è in grado di discriminare gli anticorpi da infezione acuta da quelli prodotti a seguito di infezioni pregresse o da vaccinazioni effettuate in passato.

### **4) Visto che la valutazione è semiquantitativa, la protezione anticorpale è considerata adeguata anche in caso di debole positività? Ed in caso di negatività come mi devo comportare? Significa che l’animale non è protetto?**

Per i diversi agenti virali sono stati fissati dei titoli anticorpali minimi, al di sopra dei quali l’animale è considerato protetto. Tuttavia, la comunità scientifica internazionale è concorde nel considerare come protettiva, almeno negli animali adulti, la sola presenza di anticorpi specifici, a prescindere dal titolo riscontrato. Infatti, poichè questi anticorpi sono espressione di un’immunità attiva (a differenza di quanto accade per gli anticorpi colostrali), l’animale dovrebbe quasi certamente possedere cellule della memoria pronte ad attivarsi al momento di un nuovo contatto con il patogeno. Inoltre, se ci sono anticorpi specifici, è verosimile pensare alla contemporanea presenza dell’immunità cellulomediata, che solo test estremamente complessi potrebbero valutare. Del resto, la possibile presenza di cellule della memoria e di cellule effettrici della risposta cellulare già sensibilizzate fa sì che anche animali completamente negativi al test anticorpale possano essere forniti di adeguata protezione.

### **5) Gli anticorpi vaccinali identificati mediante questi kit sono sempre “protettivi”?**

Come già detto, i test basati sulla tecnologia ELISA non rilevano esclusivamente gli anticorpi protettivi, ma è possibile affermare che esiste una buona correlazione tra positività al test e protezione dalla malattia.

## **6) In caso di positività, la memoria immunologica che i test identificano può anche essere la conseguenza di pregressa infezione? Ed in tal caso è memoria immunologica “protettiva”?**

Poiché, almeno nel cane e nel gatto, non esistono test sierologici in grado di rilevare in maniera selettiva i soli anticorpi da vaccinazione, la positività al test si osserva anche se l'animale ha avuto un'infezione pregressa sostenuta dallo stesso patogeno per il quale si stanno cercando gli anticorpi vaccinali. Gli anticorpi prodotti da infezione attiva sono certamente protettivi e, in molti casi, questa protezione può durare per tutta la vita.

## **7) Quali sono le informazioni che possiamo ottenere dal risultato di questi kit e come possiamo utilizzarle dal punti di vista pratico?**

I kit per la determinazione degli anticorpi vaccinali forniscono una stima abbastanza attendibile del livello di protezione di cani e gatti nei confronti dei principali patogeni per cui è possibile vaccinare (ad eccezione della leucemia felina per la quale tali test non sono disponibili). Dal punto di vista pratico questi test possono essere utilizzati per stabilire la necessità o meno di sottoporre cani e gatti ai richiami periodici delle vaccinazioni, soprattutto nel caso in cui un animale abbia già sviluppato una grave reazione post-vaccinale. Nel gatto esiste poi la problematica del cosiddetto fibrosarcoma da vaccinazione, la cui reale portata è stata però notevolmente ridimensionata negli ultimi anni, in quanto gli studi epidemiologici su larga scala hanno dimostrato che tutti gli stimoli infiammatori ripetuti, inclusa la inoculazione di altri farmaci, predispongono all'insorgenza di questa patologia letale.

## **8) Come devo adeguare la profilassi vaccinale sulla base dei risultati?**

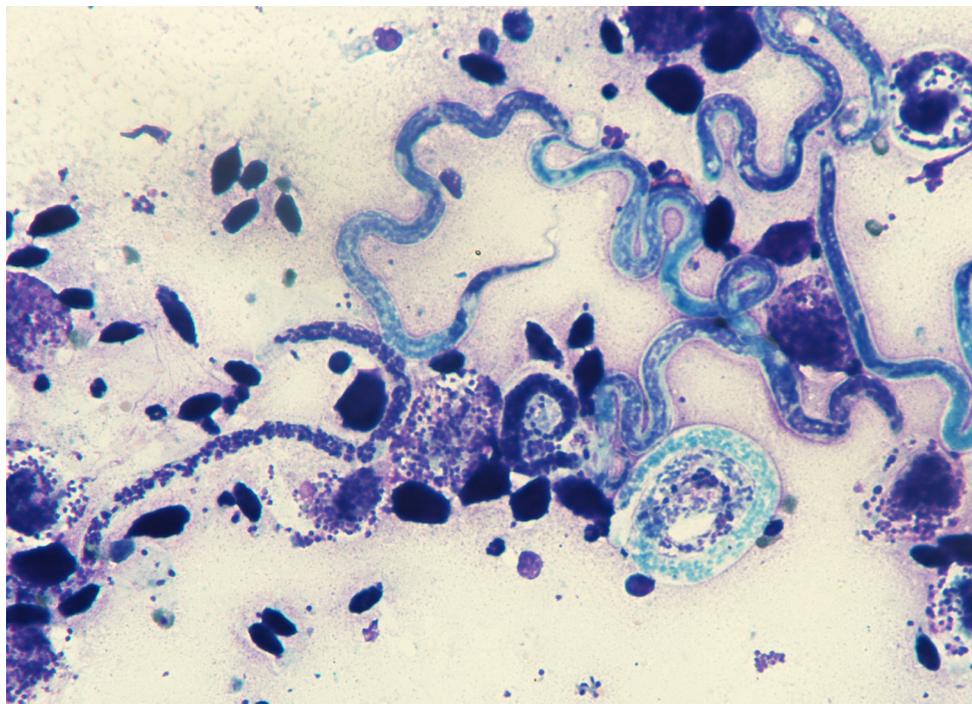
In caso di positività al test anticorpale e soprattutto in presenza di titoli anticorpali elevati, è possibile evitare l'intervento vaccinale relativo agli agenti per cui è stata dimostrata la presenza di immunità. Il cane o il gatto devono però essere regolarmente vaccinati per i patogeni per i quali la determinazione anticorpale non è stata effettuata per mancanza di test disponibili oppure ha dimostrato l'assenza di immunità specifica.

## 9) Questi test sono effettuabili sia nei cuccioli sia negli adulti?

I test commerciali sono stati standardizzati e sono registrati solo per la determinazione degli anticorpi vaccinali, per cui andrebbero utilizzati esclusivamente negli adulti o nei cuccioli e gattini al di sopra delle 16 settimane. Negli animali di età inferiore la presenza di anticorpi colostrali interferisce con la determinazione degli anticorpi vaccinali, per cui la positività al test potrebbe essere riconducibile all'immunità passiva di origine materna anziché ad una sierconversione post-vaccinale. Tuttavia, un obiettivo futuro potrebbe essere proprio l'impiego dei test commerciali per la titolazione degli anticorpi colostrali nella prospettiva della vaccinazione. Gli anticorpi colostrali, infatti, interferiscono con le vaccinazioni andando a bloccare gli antigeni ed impedendo ad essi di stimolare il sistema immunitario. Se adeguatamente standardizzati per la determinazione dell'immunità colostrale, questi test sarebbero di aiuto nell'individuare il momento più opportuno per effettuare gli interventi vaccinali, quando cioè gli anticorpi materni sono scomparsi o sono presenti ad un titolo talmente basso da non interferire con le vaccinazioni.

## LA FILARIOSI CUTANEA: LE LINEE GUIDA ESDA

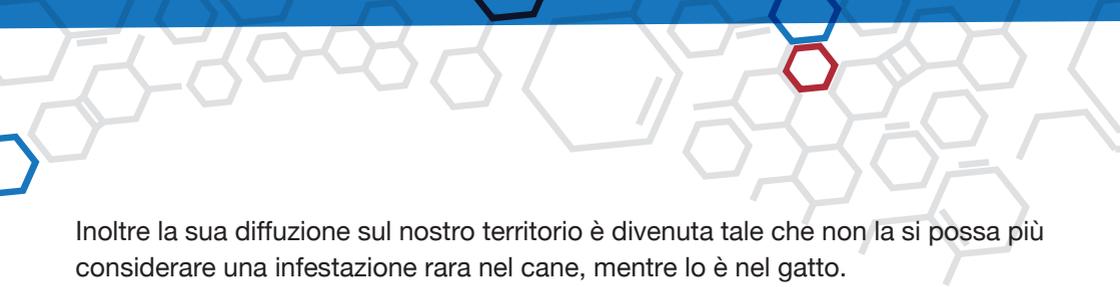
di Walter Bertazzolo & Francesco Albanese



*Immagine 1 – Microfilarie in un nodulo sottocutaneo parassitario.*

Cari colleghi, dopo le linee guide della società Europea di Dirofilariosi e Angiostrongilosi (ESDA) relative alla filariosi cardiopolmonare canina e felina, vi parliamo oggi delle medesime indicazioni relative alla filariosi cutanea (da *Dirofilaria repens*, anche nota come *Noctiella repens*).

Questa parassitosi ha delle conseguenze cliniche molto più modeste rispetto alla forma cardiopolmonare, restando per lo più asintomatica o causando noduli sottocutanei. Tuttavia essa può condurre a problemi diagnostici differenziali con l'infezione da *D. immitis*, in particolare allorché si rilevino microfilarie circolanti.



Inoltre la sua diffusione sul nostro territorio è divenuta tale che non la si possa più considerare una infestazione rara nel cane, mentre lo è nel gatto.

L'infestazione viene individuata mediante:

- 1) rilievo accidentale di microfilarie circolanti: una accurata valutazione microscopica permette la differenziazione con le larve da *D. immitis*.
- 2) Identificazione di noduli sottocutanei contenenti parassiti adulti (visibili all'esame ecografico) e/o larve (visibili all'esame citologico, vedi foto a fianco).

Ovviamente il test antigenico per *D. immitis* risulterà negativo nei pazienti infetti da *D. repens*, a meno che non abbiano una infestazione mista.

A questo indirizzo potete scaricare il documento completo redatto dalla ESDA relativo alla gestione clinica di questa infestazione.

[CLICCA QUI PER SCARICARE IL DOCUMENTO COMPLETO](#)

## IL CAMPIONAMENTO IN MICROBIOLOGIA - PARTE 1

intervista alla Dr.ssa Marta Medardo

Cari colleghi, quella di oggi è la prima puntata di una serie di appuntamenti in cui parleremo di microbiologia.

Questo settore della diagnostica di laboratorio è spesso trascurato dai veterinari che non ne conoscono le varie sfaccettature. Per tale ragione abbiamo voluto iniziare a dedicargli una sezione specifica e periodica del nostro blog. Abbiamo quindi chiesto alla nostra responsabile del settore di Microbiologia, la dr.ssa Marta Medardo, di introdurci l'argomento e di iniziare a parlarci del campionamento, che rappresenta il primo step nella diagnostica microbiologica.



### **Marta, perché in generale è importante il corretto campionamento da parte del clinico?**

MM: La microbiologia diagnostica è una scienza interpretativa. Un corretto campionamento associato ad una serie di informazioni anamnestiche dettagliate consentono al veterinario microbiologo di ottenere un risultato attendibile, escludendo così la presenza di contaminanti e concentrandosi sulla ricerca e sull'isolamento del microrganismo patogeno, qualora presente.

### **Le modalità di campionamento sono uguali in generale o cambiano in base alla sede anatomica?**

MM: Ciascun sito sospetto di infezione ha le sue regole di campionamento e per approfondirle in maniera opportuna ne parleremo in diverse "puntate".

## **Possiamo però dare alcune regole di base necessarie per ottenere un campionamento adeguato, indipendentemente dal sito di infezione?**

MM: certamente, ecco alcune regole generali:

- se il prelievo viene eseguito mediante tampone, usare SEMPRE un tampone con terreno di trasporto (Amies, Stuart, Cary-Blair, terreni con carbone, sono tutti terreni validi).
- Se il campione è un pezzo tridimensionale piccolo può essere inserito in un tampone con terreno di trasporto, altrimenti può essere messo all'interno di una bottiglia da emocoltura oppure ancora inserito in un contenitore sterile (tipo contenitore sterile per urine) con aggiunta di fisiologica sterile.
- MAI utilizzare provette contenenti K3EDTA, perché ha proprietà antisettiche.
- I campioni per la microbiologia vanno conservati a temperatura ambiente. Temono il caldo (rischio di proliferazione batterica dei contaminanti) e non vanno mai congelati.
- Non temete di “negativizzare” il vostro esame con la semplice disinfezione del sito da campionare. Pulire e disinfettare la zona da campionare è invece obbligatorio e fondamentale per abbassare la carica batterica contaminante.
- È molto importante eseguire il campionamento microbiologico prima di iniziare qualsiasi trattamento antibiotico. Se ciò non fosse possibile, segnalare prontamente al laboratorio le tempistiche della terapia in atto e le molecole utilizzate.
- Descrivere sempre adeguatamente il tipo di campione prelevato (non basta scrivere tampone!) ed il sospetto clinico. Il veterinario microbiologo si orienterà molto di più se indirizzato da informazioni dettagliate.
- Se il paziente ha già eseguito un esame colturale in passato con precedente isolamento, segnalarlo al laboratorio, di modo che sia possibile valutare con una procedura più mirata eventuali recidive.
- Segnalare se il paziente presenta particolari condizioni in essere (terapia immunosoppressiva in corso, interventi chirurgici, traumi, ecc) poiché l'isolamento di taluni batteri, di norma considerati ambientali o contaminanti, possono svolgere un ruolo patogeno in particolari condizioni.

Grazie Marta, allora a presto con la prossima puntata di Microbiologia.

## IL CAMPIONAMENTO IN MICROBIOLOGIA - PARTE 2

di Marta Medardo, responsabile del settore di Microbiologia del laboratorio MyLAV

Cari colleghi, vi diamo alcuni consigli relativi alle metodiche di corretto campionamento per eseguire un esame microbiologico da lesioni cutanee nel cane e nel gatto.

**Ferite/lesioni cutanee:** rasare e disinfettare sempre adeguatamente la zona da campionare.

Procedere al prelievo mediante tampone con terreno di trasporto, avendo la massima accortezza di toccare solo le aree lesionate; si eviterà così di campionare anche la flora commensale normalmente presente sulla cute.

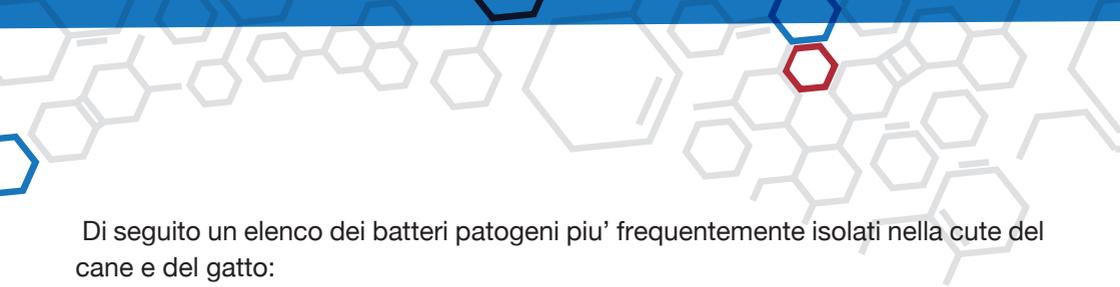
Se la lesione consta di cisti/pustole/vescicole, utilizzare una siringa per prelevare sterilmente il liquido all'interno.

In caso di curettage chirurgico, prelevare una porzione di tessuto al limite tra la lesione ed il tessuto sano.

**Ascessi:** se possibile inviare una porzione bioptica della parete, altrimenti eseguire un tampone profondo che raggiunga la parete interna dell'ascesso. E' lì che i batteri sono vivi ed in attiva replicazione. Viceversa il pus da solo potrebbe risultare negativo poiché contenente solo batteri morti o inibiti.

Come per qualsiasi altro esame microbiologico, il prelievo deve essere fatto prima dell'inizio della terapia antibiotica. In caso questo non sia possibile, è importante segnalare al laboratorio che principio attivo state usando e da quanto tempo avete iniziato la terapia.



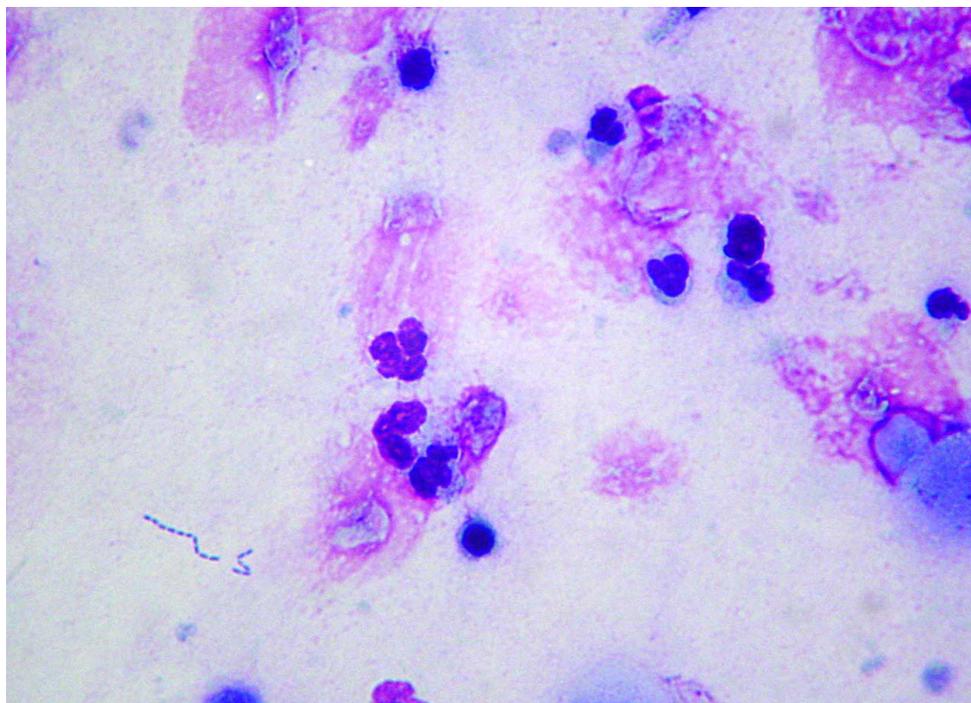


Di seguito un elenco dei batteri patogeni piu' frequentemente isolati nella cute del cane e del gatto:

- *Staphylococcus pseudintermedius*.
- *Staphylococcus aureus*.
- *Staphylococcus* spp. coagulasi negativi (CNS).
- *Staphylococcus schleiferi*.
- Enterobatteri (soprattutto *E.coli*, *Proteus* spp.).
- *Pseudomonas aeruginosa*.
- *Streptococcus/ Enterococcus* spp.
- *Actinomyces* spp./ *Nocardia* spp.
- *Clostridium* spp. (soprattutto *C. perfringens*).

## IL CAMPIONAMENTO IN MICROBIOLOGIA - PARTE 3

di Marta Medardo, responsabile del settore di Microbiologia del laboratorio MyLav



*Immagine 1 – Esame citologico da lavaggio bronco alveolare (BAL).*

Cari colleghi, vi parleremo oggi delle metodiche di corretto campionamento per eseguire un esame microbiologico del lavaggio bronco alveolare (BAL).

Partiamo da una premessa fondamentale: il BAL è uno tra i campioni **più soggetti alla contaminazione ambientale**, sia per l'anatomia dell'apparato respiratorio (che è costantemente a contatto con l'ambiente esterno), sia per metodica di esecuzione (il liquido del lavaggio viene immesso all'interno dell'endoscopio, che inevitabilmente viene a contatto con la mucosa orale, e viene poi riaspirato).



Per questo motivo potrebbe essere utile far pervenire al laboratorio anche un lavaggio con fisiologica sterile dell'endoscopio, ottenuto prima dell'esecuzione del BAL (identificandolo come PRE lavaggio sulla provetta, in modo da poterlo distinguere).

Dalla semina e dal confronto di entrambi i campioni, è così possibile escludere gli eventuali contaminanti ambientali presenti nel canale di servizio dell'endoscopio.

Un altro problema rilevante è la contaminazione legata alla translocazione di germi del cavo orale, introdotti dall'endoscopio stesso durante il transito nelle vie aeree.

Un accorgimento fondamentale per ottenere dei risultati significativi, è l'esecuzione dell'esame citologico unitamente all'esame microbiologico del BAL. La conferma o meno di un'infezione batterica mediante la citologia, è di sicuro aiuto nell'interpretazione dei risultati. Questo esame aiuta inoltre a non sovrastimare un risultato positivo all'esame microbiologico.

### **In che modo trasportare i campioni ?**

È sufficiente utilizzare una provetta vuota sterile, da circa 5 mL per ciascun campione. Immettere il BAL all'interno di un tampone non è scorretto: il campione è comunque processabile, anche se in questo modo il volume di liquido inviato sarà inferiore e quindi è più facile incorrere in un falso negativo.

Ecco di seguito alcuni dei principali patogeni isolati nei BAL di cane e gatto:

- streptococcus spp.
- Pasteurella multocida.
- Enterobatteriacee (in primis Escherichia coli).
- Bordetella bronchiseptica.
- Staphylococcus spp.
- Pseudomonas aeruginosa.

## COME IDENTIFICARE UN MRSA - SCREENING BIOMOLECOLARE PER STAFILOCOCCI METICILLINO RESISTENTI (NOVITÀ 2019)

di Marta Medardo, responsabile del settore di Microbiologia del laboratorio MyLav

Dal 1° gennaio 2019 abbiamo a disposizione per voi una serie di nuove indagini diagnostiche in vari settori (microbiologia, oncologia, patologia, dermatologia, ecc).

Vi parleremo oggi dello screening biomolecolare per stafilococchi meticillino resistenti.

### Cos'è la meticillino-resistenza?

Per meticillino-resistenza si intende la resistenza nei confronti degli antibiotici beta-lattamici (quindi penicilline, cefalosporine e carbapenemi), caratteristica di alcuni ceppi di *Staphylococcus* spp.

Storicamente questi meccanismi di resistenza furono studiati per lo *Staphylococcus aureus* (da cui l'acronimo "methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*", MRSA), ma oggi sappiamo che il fenomeno riguarda anche *Staphylococcus pseudintermedius* (methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*, MRSP) e *Staphylococcus intermedius* (methicillin-resistant *Staphylococcus intermedius*, MRSI).

### Perchè è così importante?

Questi particolari batteri hanno un'elevata velocità di diffusione ed altrettanto velocemente sviluppano multiresistenze nei confronti delle altre classi di antibiotici. Sono inoltre un problema grave e sempre più emergente in ambito veterinario, per quanto riguarda le infezioni nosocomiali.



*Immagine 1 – Esempio di Staphylococcus spp. meticillino resistente su MRSA brilliance agar.*

## Quali sono i fattori di rischio?

Immunodepressione, operazioni chirurgiche, ricovero in reparti di terapia intensiva, contatto con pazienti infetti o medici portatori sani di un ceppo meticillino-resistente, permanenza in ambito ospedaliero per più di 48 ore, presenza di cateteri o di altri dispositivi medici transcutanei.

A livello microbiologico il gold standard tra i test fenotipici per predire questo fenomeno è lo screening di sensibilità nei confronti dell'antibiotico cefoxitina (per tutti gli *Staphylococcus* spp. tranne *Staphylococcus pseudintermedius*. Per quest'ultimo è più attendibile lo screening di sensibilità nei confronti dell'oxacillina).

## Come posso confermare di essere di fronte ad un ceppo di MRSA/MRSP/MRSI?

Mediante identificazione con tecniche biomolecolari (real-time PCR) del gene *mecA*, ovvero il principale gene responsabile del fenomeno della meticillino-resistenza.

È per questo motivo che il nostro laboratorio offrirà questo particolare screening sia per pazienti con un'infezione in atto (dunque a partire dall'isolamento nell'esame colturale), sia per pazienti sani potenzialmente portatori del batterio multiresistente (in questo caso è necessario un tampone nasale SENZA terreno di trasporto).

## **RICERCA DI SOSTANZE INIBENTI IN MICROBIOLOGIA (NOVITÀ 2019)**

di Marta Medardo, responsabile del settore di Microbiologia del laboratorio MyLav



Cari colleghi, oggi parliamo di un'altra novità introdotta nel 2019 nel settore della Microbiologia, ovvero la ricerca delle sostanze inibenti.

### **In cosa consiste questo test e cosa sono le sostanze inibenti?**

La ricerca delle sostanze inibenti consiste in un saggio su piastra che serve a verificare se il campione in esame presenta un potere antibatterico residuo (ovvero se presenta residui di sostanze dotate di attività antibiotica).

### **A cosa serve?**

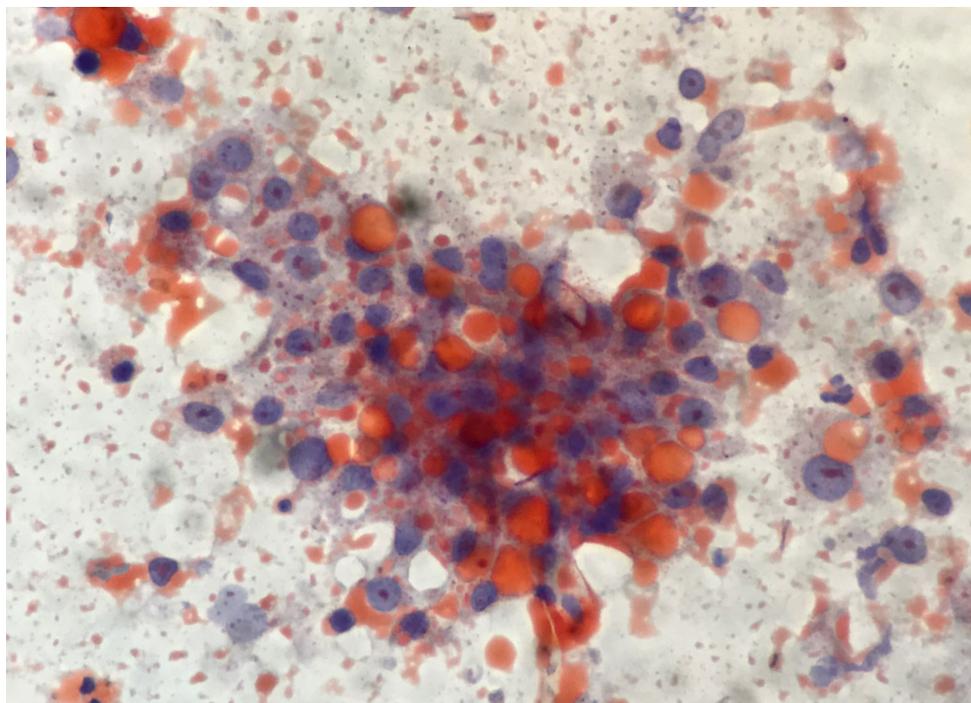
Questo esame, eseguito da solo o in concomitanza con l'esame colturale, serve a capire se il risultato dell'esame microbiologico può essere eventualmente falsato dalla presenza di tali residui. In particolare di fronte ad un esito di un colturale negativo, questo test permette di discriminare gli eventuali falsi negativi dovuti all'inibizione della crescita da parte di residui antibatterici contenuti nel campione.

### **Su quali campioni è possibile eseguire questo test?**

Questo test è eseguibile solo su campioni liquidi (urine, latte etc.).

## LE COLORAZIONI CITOCHIMICHE/ISTOCHEMICHE - PARTE 6: L'OIL RED-O

di Maria Massaro & Walter Bertazzolo



*Immagine 1 – Campione citologico di liposarcoma in cui è stato confermato il contenuto lipidico delle cellule neoplastiche con l'Oil Red-O. Le goccioline di colore arancione rappresentano per l'appunto i lipidi marcati positivamente.*

La colorazione cito/istochimica OIL RED-O è utilizzata per evidenziare i lipidi, sostanze solubili in solventi non polari e dunque insolubili in acqua. Questo colorante fa parte della categoria dei lisocromi, un gruppo di sostanze liposolubili che hanno la capacità di sciogliersi nelle molecole lipidiche trasmettendo loro la propria colorazione. Al microscopio i lipidi risulteranno di colore rosso-arancione, mentre i nuclei saranno di colore blu, grazie alla contro colorazione con ematosilina.

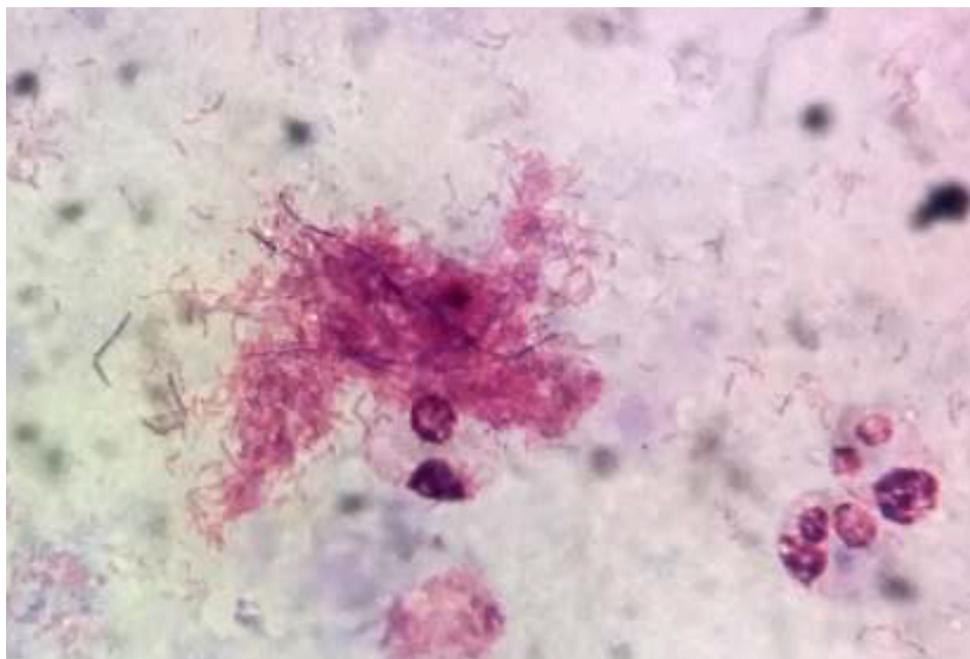


La colorazione viene richiesta quando si sospetta la presenza di cellule contenenti lipidi. Per esempio in tumori mesenchimali di sospetta derivazione adipocitica (liposarcomi). Oppure può essere utile per confermare l'accumulo di lipidi all'interno di cellule durante processi degenerativi/dismetabolici, come nella lipidosi epatica. La colorazione può essere eseguita su prelievi citologici essiccati all'aria o su pezzi istologici. Questi ultimi però non possono essere fissati in formalina e devono essere trattati con appositi fissativi (fissativo di Baker) che evitino la dissoluzione dei lipidi, oppure su pezzi congelati e tagliati successivamente al criostato.

La foto allegata è riferita ad un campione citologico di liposarcoma in cui è stato confermato il contenuto lipidico delle cellule neoplastiche con l'Oil Red-O. Le goccioline di colore arancione rappresentano per l'appunto i lipidi marcati positivamente.

## LE COLORAZIONI CITOCHIMICHE/ISTOCHEMICHE - PARTE 7: LA COLORAZIONE DI GRAM

di Walter Bertazzolo e Maria Masaro



*Immagine 1 – Esempio di essudato settico pleurico in un gatto, in cui tra numerosi batteri Gram negativi rossi, si notano strutture filamentose Gram positive blu riferibili a Nocardia/ Actinomyces.*

La colorazione di Gram (dal batteriologo danese Hans Christian Gram che l'ha inventata) è uno strumento utilizzato per la classificazione batterica e basato sulla colorazione che questi microrganismi assumono al microscopio dopo uno specifico trattamento.

La differenza di colore tra i batteri deriva dalla costituzione della loro parete: in particolare, i Gram positivi hanno una parete batterica ricca di peptidoglicano; al



contrario i Gram negativi hanno una parete batterica contenente solo il 20% circa di peptidoglicano. Inoltre i Gram positivi presentano una membrana esterna ricca di fosfolipidi.

La tecnica prevede una colorazione differenziale che sfrutta l'utilizzo di due coloranti principali, il cristalvioletto e la safranina, e due soluzioni, quella di Lugol e quella decolorante:

- 1) il cristalvioletto colora indistintamente tutte le cellule e permette ai batteri Gram positivi di colorarsi di viola/blu.
- 2) La soluzione di Lugol ha funzione mordenzante che ha affinità con il cristalvioletto, creando un complesso più stabile nei Gram positivi e che eviterà la successiva decolorazione degli stessi.
- 3) Il decolorante attacca le strutture lipopolisaccaridiche della membrana esterna, che si trova solo nei batteri Gram negativi, permettendo al colorante di fuoriuscire dal sottile strato di peptidoglicano.
- 4) La safranina è il colorante di contrasto che permette ai Gram negativi di assumere una colorazione rossa.

La colorazione sfrutta dunque la capacità / incapacità dei batteri di trattenere o meno il complesso cristalvioletto - Lugol.

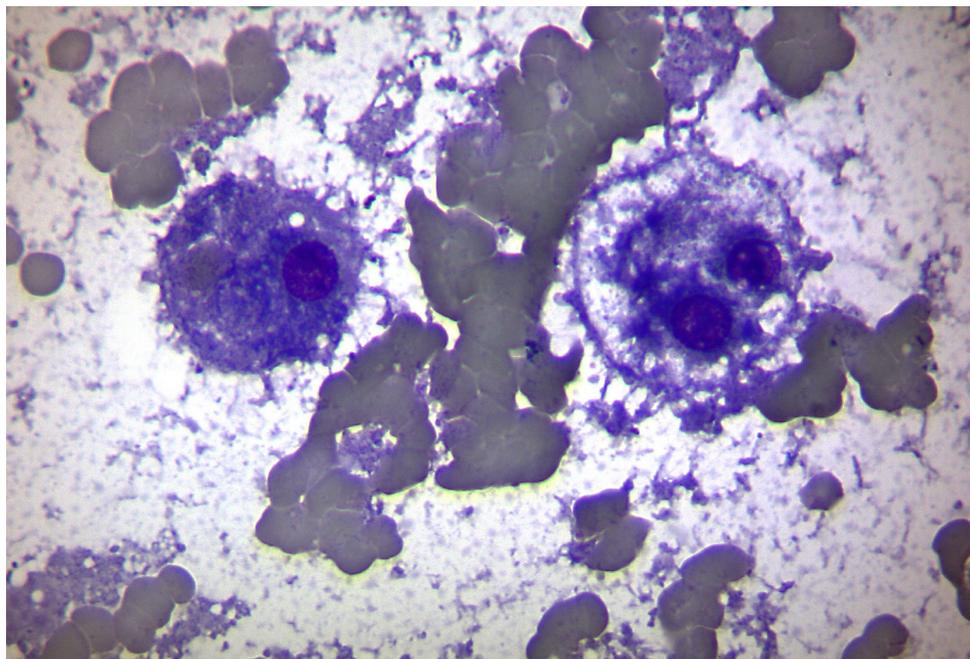
Vengono definiti Gram positivi i batteri che trattengono il colorante primario (cristalvioletto), resistono alla decolorazione con una miscela di alcol e acetone e risultano colorati in blu/viola. Vengono definiti Gram negativi quelli che vengono decolorati, perdono il colore primario e si presentano di colore rosa in seguito alla colorazione di contrasto (safranina).

Tale colorazione viene consigliata dai patologici qualora si sospetti un'infezione batterica: la presenza di una popolazione univoca di batteri Gram negativi, Gram positivi o mista, può orientare il clinico verso una terapia antibiotica più mirata, in attesa di un eventuale esame microbiologico.

Nella foto un esempio di essudato settico pleurico in un gatto, in cui tra numerosi batteri negativi rossi, si notano strutture filamentose Gram-positive blu riferibili a *Nocardia/Actinomyces*.

## COME SFRUTTARE LE COLORAZIONI SPECIALI IN CITOLOGIA EPATICA

di Marco Giraldi, Ugo Bonfanti, Maria Massaro & Walter Bertazzolo



*Immagine 1 – Citologia epatica, colorazione di tipo Romanowsky o di May-Grünwald-Giemsa.*

Cari colleghi, nei mesi scorsi abbiamo introdotto il concetto di colorazioni speciali in citologia ed istologia; vediamo come sfruttarne alcune nella pratica: vi parleremo oggi dell'utilità delle colorazioni speciali periodic acid-Schiff (PAS) e Oil-red-O (ORO) in citologia epatica.

Queste colorazioni sono utilizzate dal patologo principalmente per valutare le alterazioni citoplasmatiche degli epatociti. Le più comuni alterazioni di interesse medico sono la degenerazione idropica, la lipidosi (o steatosi) e la glicogenosi.

La **degenerazione idropica** è la perdita da parte della cellula, della capacità di regolare l'entrata e l'uscita di acqua attraverso la membrana citoplasmatica, per effetto di ipossia, tossine, radicali liberi o agenti virali.

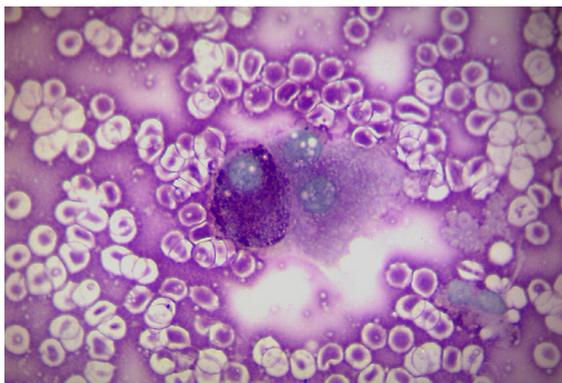
La **lipidosi** è l'esito della compromissione ad un qualche livello della via sintetica delle lipoproteine: la carenza di aminoacidi essenziali per la sintesi di apolipoproteine, l'eccessiva mobilitazione di grassi periferici, il blocco della beta-ossidazione degli acidi grassi a chetoni o una combinazione di questi sono i meccanismi responsabili della lipidosi; questa condizione è relativamente comune nel gatto e può essere primaria o secondaria ad altre patologie quali ad esempio il diabete mellito.

Le cause più frequenti di accumulo di **glicogeno** sono il diabete mellito e l'eccesso di glucocorticoidi (esogeni ed endogeni), mentre le glicogenosi su base genetica (tipo Ia e tipo III) sono più rare.

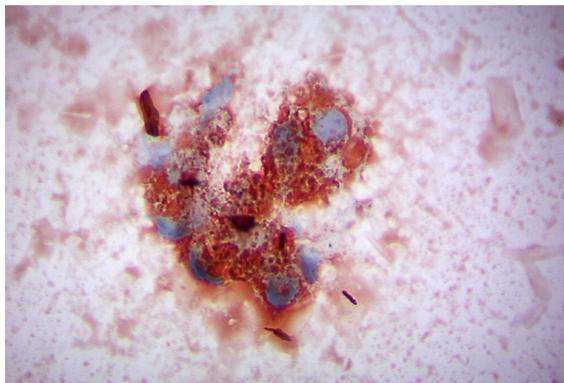
Identificare e differenziare tra loro queste alterazioni facilita il clinico nelle decisioni terapeutiche e nella scelta dell'ulteriore iter diagnostico da seguire.

Le classiche colorazioni utilizzate in citologia (colorazioni di tipo Romanowsky o di May-Grünwald-Giemsa) non permettono sempre un'agevole differenziazione di queste alterazioni (Figura 1).

Le colorazioni speciali sono quindi di grande aiuto per un'accurata valutazione del campione: la colorazione PAS permette di identificare il glicogeno citoplasmatico come accumuli di materiale di color rosso magenta intenso (Figura 2), mentre la colorazione con Oil-red-O colora i vacuoli lipidici di colore arancio (Figura 3).



*Immagine 2 – Citologia epatica, colorazione di tipo PAS, in rosso magenta intenso si evidenzia il glicogeno citoplasmatico.*

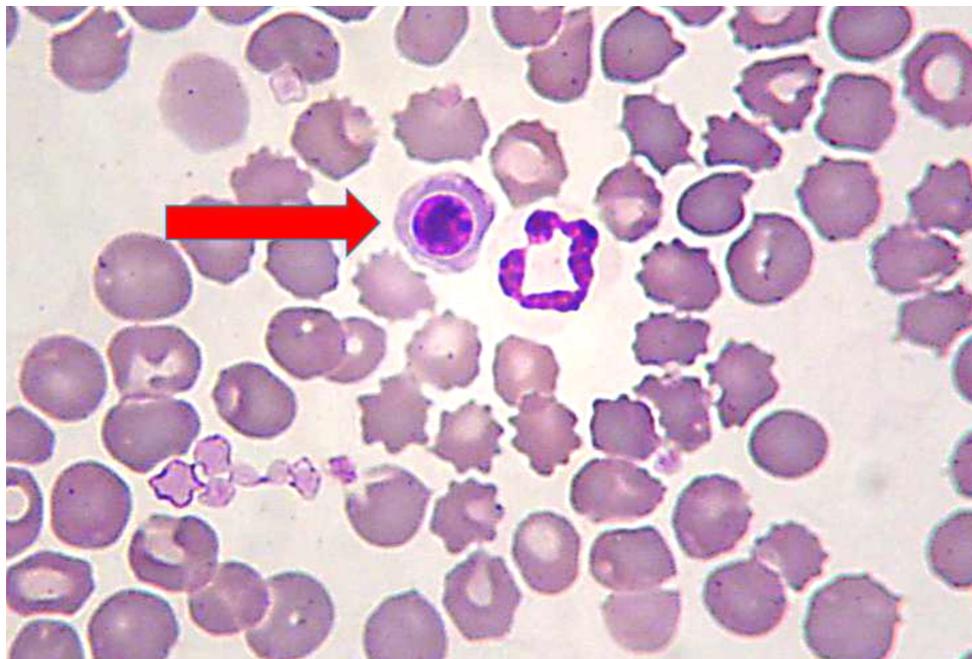


*Immagine 3 – citologia epatica, colorazione di tipo Oil-red-O si evidenziano i vacuoli lipidici di colore arancio.*

Non sono necessari trattamenti specifici sui campioni una volta raccolti, pertanto il clinico che richiede l'esecuzione aggiuntiva di queste colorazioni dovrà semplicemente aver cura di inviare al patologo almeno sei campioni citologici di fegato di adeguata cellularità.

## SCOPRIAMO I SEGRETI DELL'EMOCROMO MYLAV - PARTE 4

di Walter Bertazzolo



*Immagine 1 – La freccia indica un globulo rosso nucleato (NRBC).*

Proseguendo il nostro percorso alla scoperta dell'emogramma MyLav, oggi spiegherò il significato della sigla NRBC che segue immediatamente gli indici eritrocitari.

Questo acronimo sta per “Nucleated Red Blod Cells” ed indica pertanto i precursori nucleati degli eritrociti, che in condizioni normali non sono presenti nel sangue periferico, se non in % irrisorie.

In certe condizioni patologiche (es. Anemie fortemente rigenerative, diseritropoiesi) o para-fisiologiche (es. Ematopoiesi extra-midollare) il numero di NRBC nel sangue periferico può aumentare in maniera significativa. Il principale problema

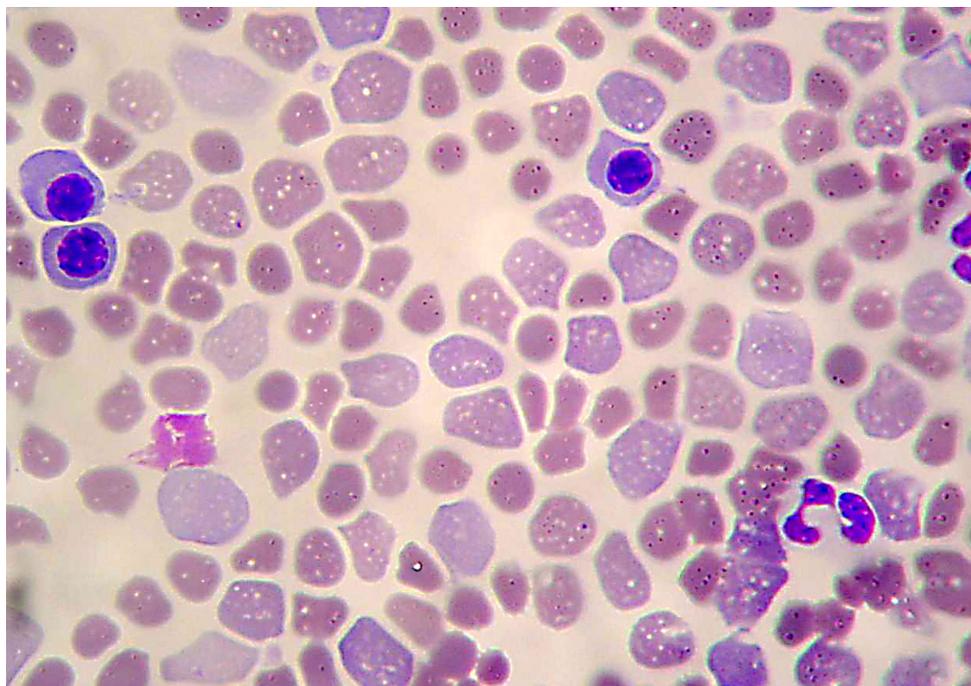
che ne risulta è che queste cellule vengono conteggiate dalle contaglobuli come se fossero dei leucociti, aumentando quindi il numero di WBC misurato in maniera artificiosa. Nessuna contaglobuli infatti, nemmeno le più sofisticate e costose, riesce a identificare in maniera accurata questi precursori, che per le loro caratteristiche morfologiche vengono di solito confusi con linfociti (vedi immagine in alto). Nel nostro emogramma questi precursori vengono conteggiati come numero di NRBC ogni 100 WBC e devono essere determinati mediante valutazione dello striscio ematico al microscopio. Per cui se nello striscio si vedono ad esempio 10 NRBC ogni 100 leucociti contati, nell'emogramma comparirà NRBC/100 WBC: 10.

Da queste permesse nasce quindi la necessità di modificare il numero dei WBC in base alla quantità di NRBC presenti, determinando il cosiddetto "WBC corretto", che esprime la reale concentrazione di leucociti nel sangue.

Ma di questo ci occuperemo nel prossimo capitolo.

## SCOPRIAMO I SEGRETI DELL'EMOCROMO MYLAV - PARTE 5

di Walter Bertazzolo



*Immagine 1 – Esempio microscopico di anemia fortemente rigenerativa con anisocitosi, policromasia e normoblastemia.*

Nel precedente appuntamento alla scoperta dell'emogramma MyLav, vi abbiamo parlato degli nRBC e di come la loro presenza possa alterare la conta dei leucociti. Essendo cellule nucleate, questi eritrociti immaturi vengono infatti contati dagli analizzatori di ematologia tra i globuli bianchi, ed in particolare vengono solitamente confusi coi linfociti dagli strumenti di misura (anche se sono laser).

Continuando a scorrere l'emogramma noterete che alla voce WBC (ovvero leucociti, "White Blood Cells"), viene riportato sia WBC che WBCcorr.

Il primo corrisponde al numero di cellule nucleate totali nel campione, il secondo solo ai veri e propri leucociti, al netto della eventuale presenza di nRBC. Se non ci sono nRBC nel campione, il numero di WBC e WBCcorr risulterà ovviamente sovrapponibile.

Ma se nello striscio ematico si osservano quantità rilevanti di nRBC, lo strumento misurerà una quantità di WBC più alta della realtà, e quindi la conta leucocitaria deve essere corretta.

Facciamo alcuni esempi: immaginiamo che la contaglobuli abbia contato 20.000/uL WBC totali, ecco cosa succede in tre differenti scenari:

- non ci sono nRBC nello striscio: allora il numero reale di WBC è 20.000/uL, quindi i WBCcorr risulteranno per l'appunto 20.000/uL.
- Ci sono 10% di nRBC sul totale delle cellule nucleate: allora il numero totale di WBCcorr sarà =  $20.000 - (20.000 \times 10/100)$  ovvero 18.000/uL.
- Ci sono moltissimi nRBC, per esempio il 50% delle cellule nucleate (come nella foto a fianco): allora il numero di WBCcorr sarà  $20.000 - (20.000 \times 50/100)$  ovvero 10.000/uL.

Da questi esempi si capisce come il numero di leucociti reali in un campione può essere fortemente influenzato dalla presenza di globuli rossi immaturi nucleati, e questo dato va tenuto ben presente nella interpretazione del leucogramma.

Ovviamente tutte le conte delle frazioni leucocitarie (neutrofili, linfociti, monociti, eosinofili e basofili) verrà fatta a partire dalla conta WBCcorr e non su quella totale, proprio per evitare errori di interpretazione clinica. Ma di questo ne parleremo nella prossima puntata.

## SCOPRIAMO I SEGRETI DELL'EMOCROMO MYLAV - PARTE 6

di Walter Bertazzolo

<b>WBC</b>			
<b>WBC</b> ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ):	<b>9.15</b>	5,6	14
<b>WBC corr.</b> ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ):	<b>9.15</b>	5,6	14,0
<b>Mielociti (%)</b> :	<b>0.00</b>	0	0
<b>Metamielociti (%)</b> :	<b>0.00</b>	0	0
<b>Neutrofili banda (%)</b> :	<b>0.00</b>	0	3
<b>Neutrofili segm. (%)</b> :	<b>67.20</b>	42,5	77,3
<b>Linfociti (%)</b> :	<b>23.30</b>	11,8	39,6
<b>Monociti (%)</b> :	<b>6.20</b>	3,3	10,3
<b>Eosinofili (%)</b> :	<b>2.80</b>	0	7
<b>Basofili (%)</b> :	<b>0.30</b>	0	1,3
<b>LUC (%)</b> :	<b>0.20</b>	0	0,83
<b>Mielociti</b> ( $\mu\text{L}$ ):	<b>0</b>	0	0
<b>Metamielociti</b> ( $\mu\text{L}$ ):	<b>0</b>	0	0
<b>Neutrofili banda</b> ( $\mu\text{L}$ ):	<b>0</b>	0	300
<b>Neutrofili segm.</b> ( $\mu\text{L}$ ):	<b>6149</b>	3800	8900
<b>Linfociti</b> ( $\mu\text{L}$ ):	<b>2132</b>	1200	4100
<b>Monociti</b> ( $\mu\text{L}$ ):	<b>567</b>	200	750
<b>Eosinofili</b> ( $\mu\text{L}$ ):	<b>256</b>	150	1100
<b>Basofili</b> ( $\mu\text{L}$ ):	<b>27</b>	0	110

Continuiamo ad approfondire i dati riportati nei nostri emogrammi: parliamo oggi della formula leucocitaria.

Come potete notare nella figura a lato, nel nostro emogramma compaiono sia la % delle singole popolazioni leucocitarie che la loro concentrazione assoluta.

Sarà forse banale sottolinearlo, ma ancora oggi molti colleghi interpretano scorrettamente questi dati.

Cerchiamo quindi di fare chiarezza.

Le **percentuali (%)** non hanno alcun significato clinico e servono solo per il calcolo delle concentrazioni delle singole popolazioni di neutrofili, linfociti, monociti, ecc.

Al fine dell'interpretazione clinica è importante valutare solo i valori delle concentrazioni dei vari leucociti per uL.

Un paziente potrebbe infatti avere una % di neutrofili apparentemente elevata (es. 80%), ma se il numero totale di leucociti è 10.000/uL, la conseguente concentrazione di neutrofili diverrebbe  $10.000 \times 0.80 = 8000/\text{uL}$ .

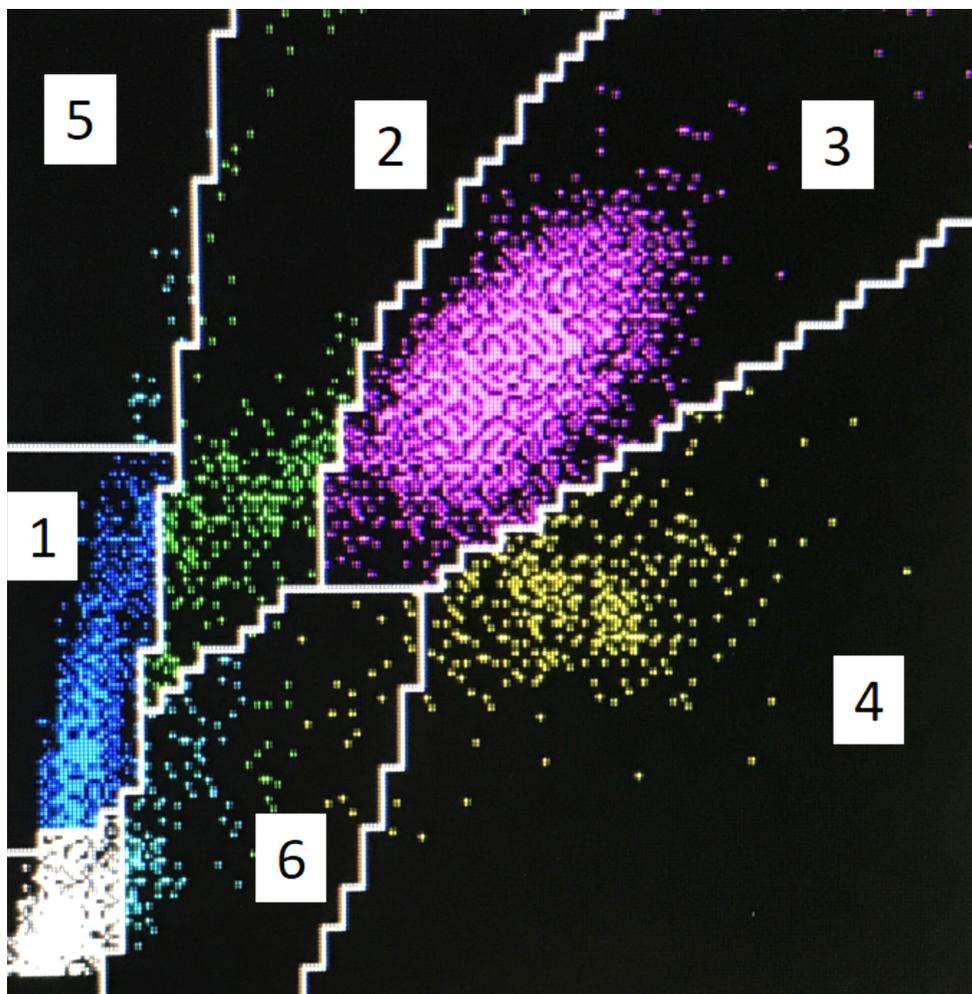
Tale valore è assolutamente normale, pertanto questo paziente non presenterebbe in realtà neutrofilia.

Viceversa potremmo avere un paziente con una % di neutrofili del 70% ma con WBC totali pari a 25.000/uL, la concentrazione di neutrofili risulterebbe pari a  $25.000 \times 0.7 = 17.500/\text{uL}$ , ovvero un valore superiore al normale (neutrofilia).

Noterete anche che tra i leucociti compare un acronimo dal significato apparentemente "oscuro": LUC. Di cosa si tratta? ne parleremo nel prossimo capitolo.

## SCOPRIAMO I SEGRETI DELL'EMOCROMO MYLAV - PARTE 7

di Walter Bertazzolo



*Immagine 1 – Strumento ADVIA metodo di identificazione delle linee cellulari in base alle dimensioni e al contenuto di mieloperossidasi.*



Cari colleghi, eccoci ad un nuovo capitolo relativo ai nostri emogrammi. Come anticipato nel capitolo n°6, vi avrei parlato oggi del significato del termine LUC, che compare nella formula leucocitaria.

Il termine LUC significa “Large Unstained Cells”. Gli strumenti per ematologia della serie ADVIA utilizzano due diversi metodi per il riconoscimento delle varie popolazioni leucocitarie.

Uno di questi utilizza la tecnologia laser per distinguere le cellule in base al loro contenuto in mieloperossidasi e in base alle loro dimensioni. Nel grafico a lato si vede come le cellule di un normale campione canino si separano: l’asse X corrisponde al contenuto in mieloperossidasi, mentre l’asse Y alle dimensioni cellulari.

In posizione 1 si raggruppano le cellule più piccole e senza mieloperossidasi (linfociti), in 2 i monociti, in 3 i neutrofili ed in 4 gli eosinofili. In posizione 6 ci sono gli aggregati piastrinici.

La posizione 5 corrisponde a cellule di ampie dimensioni, ma prive di mieloperossidasi (LUC).

Un aumento consistente delle cellule in questa area è conseguente alla presenza in circolo di elementi di ampie dimensioni, **di possibile derivazione linfoide** (es. in un linfoma leucemico) o di blasti (es. in corso di alcune leucemie).

**Pertanto un aumento della quota del LUC deve essere sempre preso come un segnale di allarme, che deve indurci a cercare cellule “anomale” nello striscio ematico.**

## 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** Nuovo possibile metodo per il monitoraggio terapeutico della sindrome di Cushing nel cane

---

- 12** Aggiornamento sull'ipertiroidismo felino allo SCIVAC di Rimini

---

- 14** Perché è importante misurare l'IGF-1 nel gatto

---

- 16** La poliartrite immuno-mediata, questa sconosciuta

---

- 18** Come stadiare e gestire la patologia renale cronica

---

- 40** Perché dobbiamo sempre eseguire due proiezioni del torace e dell'addome per avere uno studio radiografico diagnostico?

---

- 44** Nuovi test allergologici (novità 2019)

---

- 46** La cistinuria nel gatto

---

- 50** Perché misurare l'esterasi prostatica specifica canina?

---

- 52** Cos'è e a cosa serve la colinesterasi sierica?

---

- 54** Utilità (...o inutilità) della citrullinemia nelle enteropatie croniche canine

---

- 56** Quale significato dare ai monitoraggi terapeutici degli anticonvulsivanti?

---

- 58** Il prelievo ematico nel coniglio

---

- 60** Aggiornamento sul melanoma del cavo orale del cane

---

- 70** Un nuovo marker per il melanoma canino (novità 2019)

---

- 72** Le mutazioni c-kit del mastocitoma (novità 2019)

---

- 75** Lo studio perimetrale dei margini di escissione chirurgica (novità 2019)

---

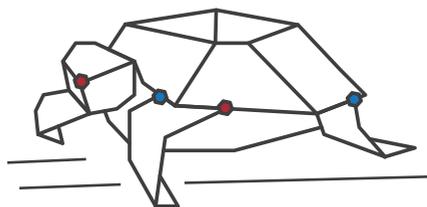
- 79** Il campionamento dei linfonodi mandibolari: istruzioni per l'uso

---

- 74** Cos'è la bactobilia in citologia?

---

- 83** La biopsia renale: come ottenere informazioni clinico-patologiche a 360°
- 
- 92** Esame del liquor cefalorachidiano: come evitare errori frustranti
- 
- 94** Come costruire un citoconcentratore per liquor cefalorachidiano
- 
- 95** Le malattie trasmesse da vettore: lo screening mediante biologia molecolare
- 
- 98** Gli agenti trasmessi da vettore e i versamenti pericardici nel cane: quale ruolo eziopatogenetico?
- 
- 101** Sierologia per laishmania: perché l'ELISA può essere una valida alternativa all'IFI
- 
- 104** Peritonite infettiva felina: le risposte dell'esperto alle domande più comuni
- 
- 110** Test parvovirus canino e cimurro
- 
- 113** La determinazione degli anticorpi protettivi: risponde l'esperto
- 
- 118** La filariosi cutanea: le linee guida ESDA
- 
- 120** Il campionamento in microbiologia - Parte 1
- 
- 122** Il campionamento in microbiologia - Parte 2
- 
- 125** Il campionamento in microbiologia - Parte 3
- 
- 126** Come identificare un MRSA - Screening biomolecolare per stafilococchi meticillino resistenti (novità 2019)
- 
- 128** Ricerca di sostanze inibenti in microbiologia (novità 2019)
- 
- 130** Le colorazioni citochimiche/istochimiche - Parte 6: l'Oil Red-O
- 
- 132** Le colorazioni citochimiche/istochimiche - Parte 7: la colorazione di Gram
- 
- 134** Come sfruttare le colorazioni speciali in citologia epatica
- 
- 137** Scopriamo i segreti dell'emocromo MyLav - Parte 4
- 
- 139** Scopriamo i segreti dell'emocromo MyLav - Parte 5
- 
- 141** Scopriamo i segreti dell'emocromo MyLav - Parte 6
- 
- 142** Scopriamo i segreti dell'emocromo MyLav - Parte 7
-



## SEDE DEL LABORATORIO

Via G. Sirtori, 9 - 20017 Passirana di Rho (MI)

Tel: 02-9308301 - Fax: 0922-624151

mail: [info@laboratoriolavallonea.it](mailto:info@laboratoriolavallonea.it)

pec: [laboratoriolavallonea@pec.it](mailto:laboratoriolavallonea@pec.it)

[www.laboratoriolavallonea.net](http://www.laboratoriolavallonea.net)

[www.mylav.net](http://www.mylav.net)