

**MYLAV**<sup>®</sup>

Laboratorio La Vallonea

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

**MYLAV**  
**BOOK**  
**2021**

AGGIORNAMENTO  
SCIENTIFICO

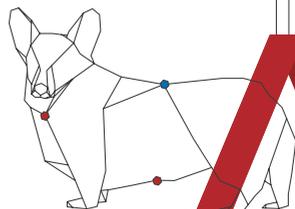
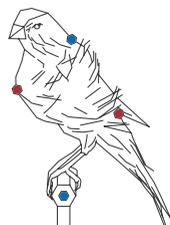
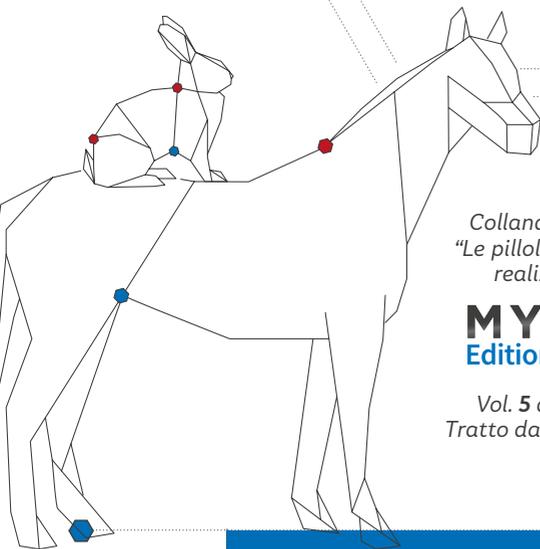
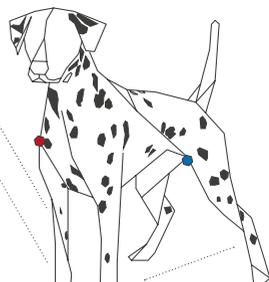
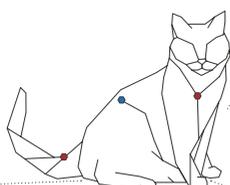
A cura di  
**Walter Bertazzolo e Ugo Bonfanti**

Tutti gli Autori degli articoli sono  
Esperti MYLAV

Collana editoriale  
"Le pillole di scienza"  
realizzata da

**MYLAV**<sup>®</sup>  
Editions *for Vets*

Vol. 5 anno 2021  
Tratto dal Blog **MYLAV**







**MYLAV**  
**B O O K**  
**2 0 2 1**

*AGGIORNAMENTO  
SCIENTIFICO*

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

*Tutti gli Autori degli articoli sono  
Esperti MYLAV*

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.

## **I nostri consulenti**

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  
Dr.ssa Maria Chiara Catalani  
Dr. Francesco Carrani  
Dr.ssa Marta Claretti  
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. Michele Marino  
Dr.ssa Marta Medardo  
Dr.ssa Lucia Minoli  
Dr. Domenico Multari  
Dr.ssa Luisa Vera Muscatello  
Dr. Fabio Necci  
Dr.ssa Margherita Orlandi  
Dr.ssa Teresa Bruna Pagano  
Prof. Saverio Paltrinieri  
Dr. Fabio Procoli  
Dr. Luca Pazzini  
Dr. Gustavo Picci  
Dr.ssa Maria Carmela Pisu  
Dr.ssa Federica Rossi  
Dr.ssa Giliola Spattini  
Dr. Giovanni Tortorella  
Dr. Luigi Venco  
Dr. Luca Vezzoni





## Presentazione

Cari Colleghi,

vi presentiamo il Book MYLAV 2021 - 5° Volume della Collana Editoriale “Le Pillole di scienza” che come ogni anno 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 Esperti Mylav e ci permette di pubblicare settimanalmente articoli di aggiornamento scientifico, consigli pratici e riassunti di articoli scientifici di recente pubblicazione.

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.

La Collana Editoriale “Pillole di scienza” nelle versioni eBook, Audiobook e Podcast fornisce differenti modalità per aggiornarti dove vuoi e quando vuoi.

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

Tutti gli Autori dei Post sono Esperti MYLAV e Collaboratori

Dir. Resp. Isidoro Grillo

## OCCHIO ALLA RAZZA!

Ogni volta che ci troviamo di fronte a risultati di laboratorio un po' "strani", prima di iniziare ad avventurarci in inutili elucubrazioni diagnostiche, è importante sempre essere certi che quella anomalia non sia semplicemente una caratteristica fisiologica normale per quella razza.

Ciò accade con una certa frequenza in particolare in ematologia, biochimica clinica ed endocrinologia: cercherò di farvi alcuni esempi più o meno frequenti: Eritrociti troppo piccoli o troppo grandi.

<b>RBC</b> ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ ):	<b>8.35</b>	6,2	8.1
<b>HGB</b> (g/dL):	<b>15.10</b>	15,7	19,9
<b>Cellular HGB</b> (g/dL):	<b>15.40</b>	15,3	19,2
<b>Hct</b> (%):	<b>49.10</b>	46,9	60,8
<b>MCV</b> (fL):	<b>58.80</b>	68,5	79,3
<b>MCH</b> (pg):	<b>18.10</b>	22,3	26,1
<b>MCHC</b> (g/dL):	<b>30.80</b>	31,6	35,1
<b>CHCM</b> (g/dL):	<b>31.40</b>	29,8	34,4
<b>CH</b> (pg):	<b>18.40</b>	21,1	25,4
<b>CHDW</b> (pg):	<b>2.29</b>	2,7	3,3
<b>RDW</b> (%):	<b>12.90</b>	11,7	13,6

*Figura 1 – Immagine tratta da un emogramma di akita inu, con un aumento degli RBC ma con concentrazione di emoglobina ed ematocrito praticamente nella norma. Trattandosi di RBC più piccoli (MCV 58) è di conseguenza ovvio avere un contenuto di emoglobina eritrocitaria ridotta (MCH e CH), a fronte di una concentrazione emoglobinica intra-eritrocitaria praticamente normale (CHCM).*

In alcune razze è comune una **microcitosi fisiologica**.

Per esempio si osserva tipicamente in alcune razze giapponesi, come gli **akita inu**. In questi soggetti sarà normale quindi osservare un numero elevato di RBC a fronte di una concentrazione di emoglobina e di ematocrito assolutamente normali.

Non si tratta quindi di una reale eritrocitosi e non bisognerà pertanto iniziare un iter diagnostico per le varie cause di policitemia.

In altre razze si può viceversa osservare una **macrocitosi fisiologica**.

È il caso ad esempio dei barboncini. Nell'immagine seguente, tratta da un emogramma di cane sano di questa razza, è evidente una riduzio-

ne del numero di RBC, che però essendo molto voluminosi, conducono ad una concentrazione di emoglobina ed ematocrito normali. Per cui non possiamo parlare di vera anemia, ma di una condizione normalissima per questo paziente.

### Piastrine enormi

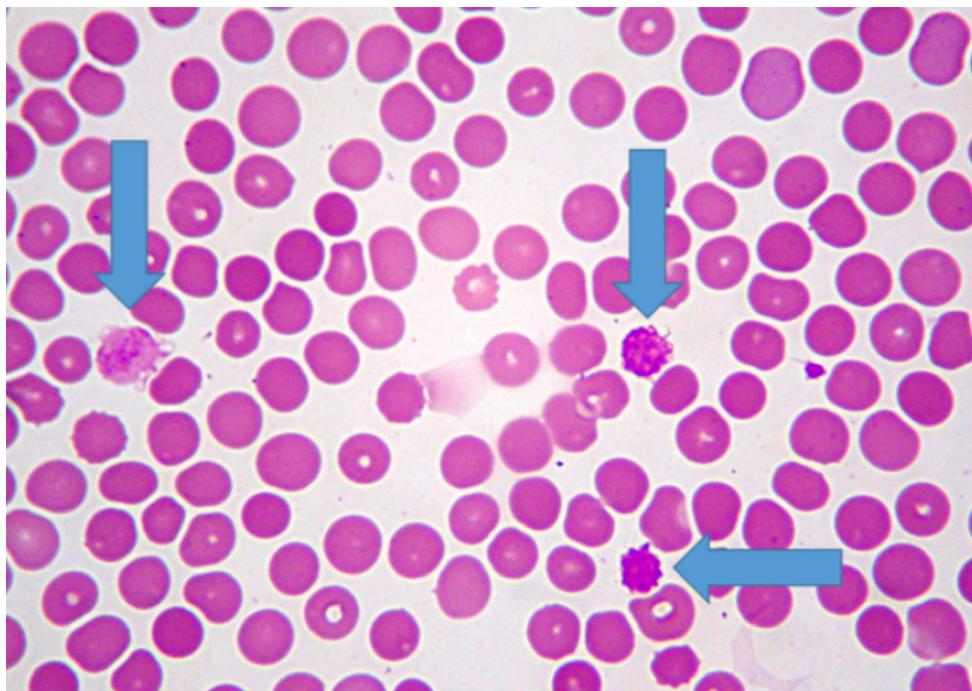
Parlando sempre di ematologia, tutti ormai conoscono la macro-trombocitosi dei **Cavalier King Charles Spaniel**, che è spessissimo associata a forme asintomatiche di piastrinopenia.

Questi cani hanno poche piastrine ma molto più voluminose, il che conduce ad una piastrinocrito pressoché normale. Dato che per la funzionalità piastrinica conta di più la massa globale circolante del numero di piastrine, è comprensibile che questi cani non abbiano problemi emostatici.

Questa alterazione familiare geneticamente trasmissibile, è stata riscontrata anche in altre razze (es. Norfolk terriers, Cairn terriers) anche se con alcune piccole differenze di mutazione coinvolta e di modalità di trasmissione. Negli Akita Inu, una manna per gli ematologi veterinari a quanto pare, è frequente imbattersi in cani sani con trombocitopenie persistenti, anche di importante entità, per le quali tuttavia non esistono ancora spiegazioni eziopatogenetiche e genetiche accertate.

<b>RBC (x10<sup>6</sup>/μL):</b>	<b>5.04</b>	6,2	8,1
<b>HGB (g/dL):</b>	<b>16.80</b>	15,7	19,9
<b>Cellular HGB (g/dL):</b>	<b>16.50</b>	15,3	19,2
<b>Hct (%):</b>	<b>55.50</b>	46,9	60,8
<b>MCV (fL):</b>	<b>110.10</b>	68,5	79,3
<b>MCH (pg):</b>	<b>33.30</b>	22,3	26,1
<b>MCHC (g/dL):</b>	<b>30.20</b>	31,6	35,1
<b>CHCM (g/dL):</b>	<b>29.80</b>	29,8	34,4
<b>CH (pg):</b>	<b>32.80</b>	21,1	25,4
<b>CHDW (pg):</b>	<b>4.54</b>	2,7	3,3
<b>RDW (%):</b>	<b>14.00</b>	11,7	13,6

*Figura 2 – Tratta da un emogramma di un barboncino normale. In questo caso la situazione è esattamente opposta rispetto al caso precedente, per cui MCH e CH risulteranno ovviamente aumentati ma con un CHCM ancora normale.*



*Figura 3 – Macrotrombocitosi in un Norfolk terrier: alcune macropiastriane sono indicate dalle frecce ed hanno un volume stimabile apparentemente simile a quello di un eritrocita.*

Abbiamo già discusso in passato sulle peculiarità ematologiche dei Greyhounds e levrieri simili, e non vi tornerò in questo blog (per chi fosse interessato può consultare l'argomento a questo link: <https://www.mylavblog.net/generica/165-165.html>)

### **Globuli bianchi immaturi**

In relazione ai leucociti, possiamo portare l'esempio degli **Australian sheep dog**, che con una certa frequenza mostrano l'anomalia di Pelger-Heut, nella quale i polimorfo-nucleati neutrofili ed eosinofili sono invece quasi esclusivamente bandati. Ciò non deve indurci a pensare in questi casi ad una sepsi!



*Figura 4 – Esempio di neutrofili con anomalia di Pelger-Heut in un pastore australiano.*

### **Malattie metaboliche, insufficienze d'organo e endocrinopatie**

Anche in biochimica clinica è possibile osservare apparenti anomalie a carico di alcuni analiti, che però sono fisiologici in quella specifica razza.

L'esempio più eclatante è quello della **creatinina dei gatti Birmani**, che è spesso **superiore a 2 mg/dL** pur in assenza di patologia renale progressiva.

E che dire dei **maltesi**, che hanno fisiologicamente gli **acidi biliari sierici molto più alti**?

E altri esempi si possono portare in endocrinologia: nei **levrieri** e nel **dogue de Bordeaux**, i profili tiroidei devono essere interpretati con cautela per evitare diagnosi errate, in quanto questi cani hanno fisiologicamente **valori di T4 più bassi** degli altri cani adulti sani.

Quindi, ogni qualvolta vi ritrovate dei valori di laboratorio un po' strani in una cane o gatto di razza, provate a googolarli perché è molto probabile che qualcuno prima di voi li abbia notati e li abbia anche già descritti.

**Walter Bertazzolo**, Direttore Scientifico di MYLAV

## VARIABILITÀ ANALITICA E BIOLOGICA: PRENDIAMO ESEMPIO DALLA CONCENTRAZIONE URINARIA

Qualunque clinico vorrebbe avere dei “numeri” di laboratorio assolutamente affidabili, che senza alcun dubbio possano essere utilizzati per definire determinate situazioni fisiologiche o patologiche.



Purtroppo, anche il più preparato degli internisti, spesso dimentica un particolare fondamentale: ovvero che questi “numeri” sono il risultato di misure analitiche e come tali soffrono di potenziali fonti di variabilità.

Prendendo spunto da alcuni studi recentemente pubblicati sulla valutazione della concentrazione dell’urina del cane e del gatto (quello che molti di noi conoscono meglio come Peso Specifico urinario, PS), cercherò di illuminarvi su alcuni aspetti della medicina di laboratorio negletti dalla maggior parte dei clinici.

### L’effetto della variabilità biologica

Gli esseri viventi appartenenti ad una determinata specie non sono ovviamente tutti uguali. La diversità biologica è il motore fondamentale dell’evoluzione. Ogni veterinario è ben conscio delle differenze estreme che esistono ad esempio nei fenotipi delle diverse razze della specie canina. Quindi, come abbiamo recentemente commentato sul nostro blog, le differenze di razza possono essere molto importanti per interpretare un determinato dato di laboratorio. Lo stesso dicasi per altre variabili (sesso, età, stato di nutrizione, ecc.). Questa variabilità viene definita inter-individuale ed è ben comprensibile.



Più subdola è invece la variabilità intra-individuale: le nostre “misure biologiche” cambiano continuamente, pensiamo ad esempio alla glicemia, alla pressione arteriosa, al peso corporeo e così via.

Queste variazioni possono essere circadiane oppure random e dipendere da tantissimi fattori (es. la dieta, l'esercizio fisico, l'assunzione di acqua, ecc.). Facciamo quindi l'esempio del PS urinario, che usiamo giornalmente per stabilire la capacità di concentrazione renale dei nostri animali.

A tale proposito, siamo abituati ad utilizzare dei cut-off molto netti per prendere delle decisioni cliniche: un cane disidratato ed dovrebbe avere delle urine con un PS > 1.040 per poter dire che i suoi reni concentrino correttamente e quindi non ci sia un sottostante problema renale. Ma quanto può cambiare il PS urinario in un singolo individuo durante la giornata? Uno studio recente ha dimostrato che la variabilità del PS urinario nei cani sani su urine raccolte alla mattina per 6 giorni diversi nell'arco di 2 settimane, è in media di circa 0.015 (Rudinsky et al, JVIM 2019). Molti di questi cani avevano oscillazioni superiori a 0.020 (ad esempio da 1.015 a 1.040). Quindi, quando dobbiamo prendere decisioni diagnostiche o cliniche sulla base di una singola misura, dobbiamo sempre domandarci: ma può questo dato essere anomalo per effetto di una variabilità biologica intra-individuale? Il dato che ho osservato può essere giustificato da una condizione patologica oppure essere più banalmente il risultato di una variabilità giornaliera di quello specifico paziente?

### **L'effetto della variabilità analitica**

Quando misuriamo un analita e produciamo il nostro fatidico “numero” di laboratorio, un'altra cosa che i clinici sottostimano, è l'effetto della variabilità analitica. Tutti vorremmo ad esempio, che quando misuriamo la creatinina non ci sia alcuna differenza tra uno strumento e l'altro, così da poter confrontare liberamente i risultati ottenuti anche con diversi strumenti o laboratori di riferimento. Purtroppo questa è una visione utopistica e un po' limitata del problema.

Ritornando all'esempio del PS urinario, gli stessi autori sopra menzionati, hanno valutato in un altro studio l'effetto della variabilità analitica dovuta all'utilizzo di

rifrattometri diversi per misurare la concentrazione urinaria (Rudinsky et al Vet Clin Pathol 2019).

Ebbene, da questo studio è risultata in generale una buona correlazione ed agreement tra 3 diversi refrattometri, mentre un'altro mostrava valori meno accettabili.

La differenza di PS urinario utilizzando diversi strumenti perfettamente calibrati, può superare infatti lo 0.005, che in prossimità di un cut-off diagnostico potrebbe farci cambiare la nostra interpretazione: pensiamo se un'urina che ha un PS reale di 1.040, venisse invece misurato come 1.032; trarremmo le stesse conclusioni cliniche? Oppure se invece che essere 1.010 fosse 1.005?

Produttori di strumenti e laboratori di analisi investono molto tempo e denaro per ridurre al minimo le diverse fonti di variabilità analitica, e questo post non vuole di certo essere una dissertazione sull'argomento, in quanto richiederebbe un livello di approfondimento che probabilmente non interessa nessun clinico. Questo post vuole però essere di provocazione, per farvi aprire un po' di più gli occhi sull'interpretazione dei risultati che ogni giorno vengono prodotti in un laboratorio di analisi. Quando li valutiamo e facciamo dei confronti tra numeri ottenuti in diversi momenti e/o con strumenti differenti, dobbiamo sempre tener conto che le differenze di risultati potrebbero essere riconducibili ad una sommatoria di variabilità: biologica + analitica.

Nello studio di Rudinsky et al (2019) è stato valutato inoltre un altro dato interessante, già studiato ampiamente in altri lavori passati: ovvero la correlazione e l'agreement tra la misura del PS urinario e l'osmolarità urinaria. Che differenze ci sono? Quale è più utile ed accurato nella stima della capacità di concentrazione urinaria? Ve ne parlerò nella prossima puntata perché si tratta di un argomento specifico interessante.

## Referenze

Rudinsky et al. Variability among four refractometers for the measurement of urine specific gravity and comparison with urine osmolality in dogs. Vet Clin Pathol 2019.  
Rudinsky et al. Variability of first morning urine specific gravity in 103 healthy dogs. J Vet Intern Med 2019.

**Walter Bertazzolo**, Direttore Scientifico di MYLAV

## LA VALUTAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DELLE URINE: PS E OSMOLALITÀ

La valutazione della capacità di concentrare le urine, è un aspetto fondamentale in medicina interna, in quanto ci permette di capire come sta reagendo il nostro apparato escretore alle differenti condizioni fisiologiche.

Sapere se i reni sono in grado di concentrare o diluire le urine nelle varie condizioni cliniche, è pertanto uno step essenziale per l'internista nel percorso diagnostico di molte patologie.

La concentrazione urinaria viene solitamente determinata misurando il peso specifico (PS) mediante semplici strumenti di misura a basso costo (rifrattometri). Tuttavia, il metodo di riferimento per misurare la concentrazione delle urine (o di qualsiasi soluzione in generale) è l'osmometria.



*Figura 1 – Osmometro utilizzato in ambito chimico clinico.*

Cerchiamo di spiegare quali sono le differenze tra le due misurazioni. Il PS misurato con i rifrattometri è in realtà una stima della concentrazione urinaria: lo strumento trasforma l'indice di rifrazione (IR) di una soluzione (le urine in questo caso) in un PS stimato.

Molti rifrattometri riportano infatti entrambe le scale di misura (IR e PS). Questa semplice tecnologia viene sfruttata in diversi ambiti, per esempio in viticoltura si usano i rifrattometri per valutare il contenuto zuccherino dell'uva prima della vendemmia.

Gli osmometri sono strumenti analitici che permettono di misurare con precisione la concentrazione di una soluzione: essi ne misurano infatti l'osmolarità o l'osmo-

alità. Queste non sono proprio uguali, in quanto indicano rispettivamente la concentrazione in Osmoli di soluto su litro di soluzione (Osmolarità) oppure Osmoli di soluti su kg di soluzione (Osmolalità).

Normalmente in medicina si considera la seconda misura, quindi dovremmo sempre parlare di Osmolalità.

Premesso che ovviamente la misura diretta dell'Osmolalità è più accurata della misurazione del PS, quali sono le reali differenze tra le due? Nella stragrande maggioranza dei casi esiste un'eccellente correlazione tra PS e Osmolalità, dimostrata in numerosi studi nell'uomo e negli animali. A titolo esplicativo, vi mostro alcuni esempi di confronto tra le due misure:

PS 1.001 corrisponde a circa 40 mOsm/Kg  
PS 1.005 corrisponde a circa 150 mOsm/Kg  
PS 1.010 corrisponde a circa 350 mOsm/Kg  
PS 1.015 corrisponde a circa 450 mOsm/Kg  
PS 1.020 corrisponde a circa 700 mOsm/Kg  
PS 1.040 corrisponde a circa 1600 mOsm/Kg  
PS 1.060 corrisponde a circa 2400 mOsm/Kg

Un'urina con concentrazione di 1000 mOsm/Kg per esempio, sarà due volte più concentrata di una con 500 mOsm/Kg. Una urina con PS di 1.030 sarà "approssimativamente" due volte più concentrata di una con PS di 1.015, questo perché – come già detto – la rifrattometria non misura direttamente la concentrazione, ma ne determina una stima. Nella pratica clinica l'uso del rifrattometro è ormai estremamente diffuso, anche perché esiste una notevole differenza di costi tra un rifrattometro ed un osmometro, e i risultati tra le due misure sono quasi sempre correlati in maniera sufficiente per garantire una interpretazione clinica corretta.

Ci sono però situazioni in cui la misurazione dell'osmolalità urinaria è sicuramente più "sicura" per la valutazione della concentrazione urinaria, di quella del PS. Per capirlo, devo fare una premessa. L'osmolalità di una soluzione è una proprietà colloidale, ovvero significa che il suo valore dipende esclusivamente dal numero di ioni o molecole in essa contenute, non dalla loro dimensione. Immaginiamo di



avere tre soluzioni acquose differenti: nella prima abbiamo disciolto 10 piccoli ioni (per esempio di sodio e cloro), nella seconda dieci molecole di glucosio e nella terza 10 molecole di albumina. Le tre soluzioni avranno la stessa osmolalità. Tuttavia siccome i tre diversi soluti hanno pesi completamente diversi (l'albumina è molto più grande e pesa molto di più del glucosio, che a sua volta pesa molto di più dei piccoli ioni), il PS delle tre soluzioni sarà differente.

Ci sono studi dai risultati un po' contrastanti, che hanno valutato l'effetto che i vari soluti "pesanti" possono avere sul PS urinario. In molti casi il PS rimane una stima sufficientemente accurata per una valutazione clinica, ma se abbiamo a che fare con urine con un elevato contenuto di soluti "patologici" come glucosio, proteine, ketoni, farmaci, mezzi di contrasto radiografici, emoglobina, bilirubina, ecc., la valutazione della loro concentrazione mediante la stima del PS potrebbe essere inficiata, e quindi sarebbe meglio, per valutare la effettiva capacità di concentrare o diluire le urine da parte del rene, fare riferimento alla osmolalità misurata.

**Walter Bertazzolo**, Direttore Scientifico di MYLAV

**Ugo Bonfanti**, Direttore Sanitario di MYLAV



## **COLORAZIONI ISTOCHIMICHE ED IMMUNOISTOCHIMICHE**

Le colorazioni istochimiche speciali e l'esame immunoistochimico sono delle tecniche diagnostiche ancillari all'esame istopatologico, che possono essere richieste/suggerite per confermare la diagnosi o fornire informazioni aggiuntive rispetto a quanto osservabile con la sola valutazione istopatologica (con colorazione di routine Ematossilina ed Eosina).

Nella maggior parte dei casi si tratta di esami eseguibili sul campione già inviato in formalina e solo una piccola percentuale di colorazioni va eseguita su campione di tessuto non fissato in formalina e congelato. Anche se si differenziano significativamente per la metodologia, semplicisticamente si può affermare che entrambe le tecniche hanno l'obiettivo di identificare/evidenziare strutture/componenti intra o extracellulari nelle sezioni di tessuto.

### **Colorazioni istochimiche**

Con tali metodiche, la sezione di tessuto viene sottoposta a reazioni chimiche attraverso le quali le strutture tissutali assumono colorazioni diverse a seconda di cosa si vuole evidenziare.

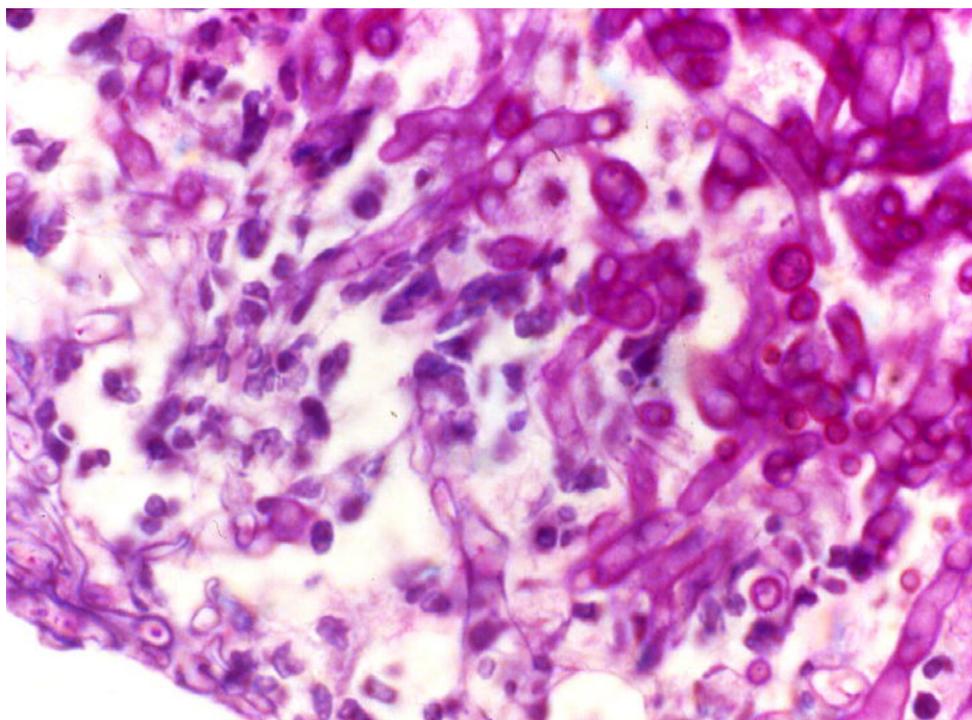
Possono essere utilizzare per:

- **Evidenziare strutture/componenti tissutali** (collagene, amiloide, membrane basali ...)
- **Evidenziare la presenza di materiale intracellulare** (mucina, depositi di ferro, materiale di derivazione ematica, melanina, granuli intracitoplasmatici dei mastociti,...)
- **Identificare agenti eziologici** (ife fungine, batteri, alghe,...)

È importante sottolineare che per quanto riguarda la ricerca/evidenziazione di agenti eziologici, la colorazione istochimica NON si sostituisce all'esame colturale

o alla biologia molecolare e generalmente non permette di classificare la specie dell'eventuale patogeno.

La colorazione istochimica semplicemente permetterà di “vedere meglio” l'agente eziologico se presente. Talvolta la morfologia dell'agente sarà sufficiente a classificarlo precisamente ma talvolta si potrà solo confermare la presenza di un agente e classificarlo come batterico, fungino, ecc. Infine, alcune di queste colorazioni possono essere applicate con la stessa utilità anche su preparativi citologici (colorazioni citochimiche).



*Figura 1 – Colorazione istochimica PAS per evidenziare ife fungine (ben visibili in rosa intenso/fucsia), in un caso di aspergillosi nasale del cane.*

## Immunoistochimica

L'esame immunoistochimico, come indica il nome stesso, prevede l'utilizzo di anticorpi attraverso i quali sarà possibile individuare specifiche molecole nella sezione di tessuto.

L'esame immunoistochimico può essere eseguito per via diretta o indiretta, anche se attualmente la maggior parte dei kit e coloratori automatici, utilizzano una metodologia indiretta. La metodica indiretta si avvale di un anticorpo definito "primario" che legherà un determinato antigene che si vuole identificare nella sezione di tessuto. L'avvenuto legame tra antigene e anticorpo primario verrà evidenziato attraverso una reazione enzimatica con deposizione di un colorante (generalmente marrone) nel sito di avvenuta reazione, mediante l'uso di un anticorpo secondario in grado di innescare la reazione che conduce alla formazione di colore.

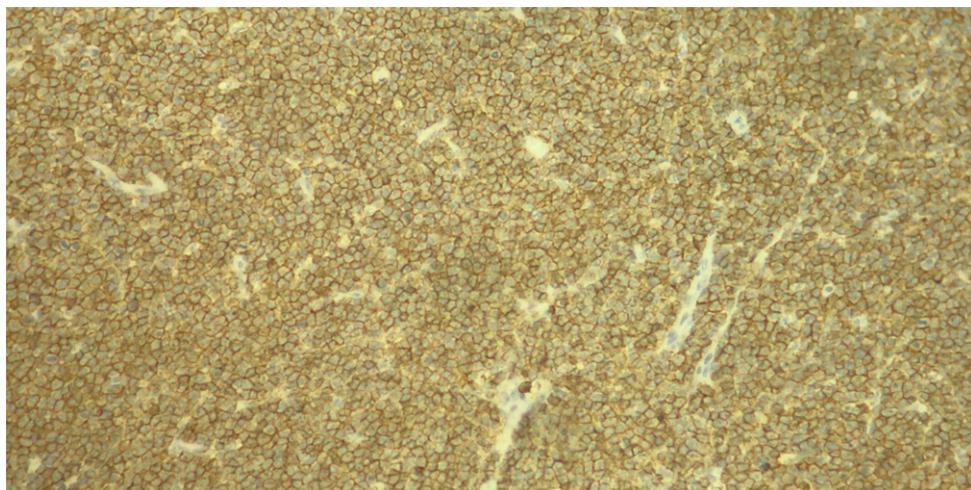
### Quali sono i principali utilizzi dell'esame immunoistochimico?

Nella diagnostica di routine l'esame immunoistochimico viene principalmente utilizzato per una migliore caratterizzazione delle neoplasie la cui istogenesi non può essere totalmente definita con la sola valutazione istopatologica.

Per tale scopo vengono utilizzati anticorpi che legano componenti cellulari intracitoplasmatici (es. citocheratine, vimentina), della membrana cellulare (es. CD3, CD20) o nucleari (es. MUM1) che sono specifiche e presenti in una o più popolazioni cellulari. L'utilizzo di uno o, più spesso anticorpi multipli, permette spesso di identificare il fenotipo e l'istogenesi delle cellule neoplastiche.

È **essenziale** ricordare che tale tecnica non permette differenziare tra processi **neoplastico e reattivo in popolazione cellulari ben differenziate**.

Al contrario, in neoplasie anaplastiche o scarsamente differenziate, l'esame immunoistochimico può essere non definitivo, in quanto il processo di "sdifferenziazione" può implicare la "perdita" dell'espressione delle molecole fenotipiche specifiche che le caratterizzano, e pertanto risultare non definitivamente classificabili. Si



*Figura 2 – Esempio di colorazione immuno-istochimica con CD20 per la conferma e la tipizzazione di un linfoma B-cell.*

segnala inoltre che il numero di anticorpi disponibili e di cui è presente una sufficiente letteratura di riferimento in medicina veterinaria, è limitato, e talvolta non è possibile proporre l'utilizzo di marcatori specifici per l'una o l'altra istogenesi.

Altre indicazioni per eseguire/suggerire l'esame immunoistochimico sono:

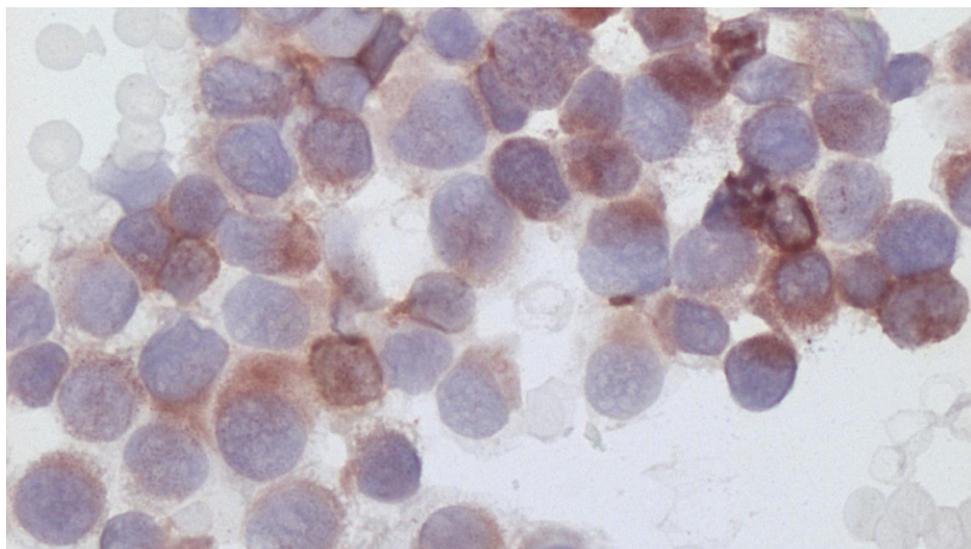
- La valutazione del grado di proliferazione di una popolazione neoplastica (mediante KI67)
- L'identificazione di determinate molecole a scopo clinico-prognostico-terapeutico (es. CD117/CKIT, CSPG4)
- L'identificazione di agenti eziologici.

Per la ricerca di agenti eziologici è necessario sottolineare alcune differenze rispetto alle colorazioni istochimiche speciali discusse precedentemente. Come già detto, nell'esame immunoistochimico si testano anticorpi specifici e se l'esito è positivo si potrà confermare la presenza di un agente specifico che si è ricercato. L'esame immunoistochimica per malattie infettive in medicina veterinaria trova un

particolare utilizzo per malattie virali (es. Coronavirus nelle lesioni da FIP del gatto) e per la ricerca di amastigoti di Leishmania.

**È importante** segnalare come alcuni fattori possano incidere sull'ottimale riuscita dell'esame immunocitochimico e quindi rendere l'esame non praticabile o definitivo: alcuni trattamenti (es. corticosteroidi nel linfoma), possono alterare le caratteristiche fenotipiche delle cellule che possono risultare negative. Un'inadeguata (scarsa o eccessiva) **fissazione** del campione, con presenza di autolisi e necrosi, possono inficiare l'ottimale riuscita dell'esame. Se il campione è molto esiguo potrebbe essere sconsigliabile eseguire l'esame immunocitochimico (così come altri approfondimenti).

Va infine sottolineato che alcune solo alcune colorazioni immuno-istochimiche possono essere anche applicate ai campioni citologici (es. Immuno-citochimica per CD3 e CD20, per la tipizzazione di un linfoma), ma è importante rivolgersi al laboratorio per avere informazioni sulla fattibilità dell'esame. Inoltre, la qualità e la fattibilità della procedura sui campioni citologici, è fortemente influenzata dalla qualità e dalla cellularità degli stessi.



*Figura 3 – Esempio di colorazione immuno-citochimica su un preparato citologico di linfoma.*

## Esempi

**Linfoma:** in caso di sospetto linfoma, o per perfezionarne la classificazione, si ricorre ad anticorpi per identificare cellule ad immunofenotipo T o B rispettivamente.

Nota bene: esistono casi di linfoma negativi per entrambi gli anticorpi. Talvolta l'esame immunoistochimico non è sufficiente a definire la diagnosi di linfoma e potrebbe essere suggerito l'esame di clonalità linfoide. Va sottolineato che quest'ultimo non va usato come definizione del fenotipo, ma per discriminare tra una neoplasia linfoide o processo reattivo/infiammatorio non neoplastico.

**Mastocitoma:** le colorazioni istochimiche Blu di Toluidina e GIEMSA spesso evidenziano i granuli dei mastociti (normali e neoplastici), che vengono definiti metacromatici. Queste colorazioni possono essere suggerite per confermare il sospetto di mastocitoma e migliorare la sensibilità nel ricercare e quantificare mastociti in un linfonodo. Quest'ultima evenienza permette di classificare l'eventuale coinvolgimento linfonodale secondo la classificazione di Weishaar (J. Comp.Path. 2014, Vol. 151, 329-338).

Nota bene: le negatività per Blu di Toluidina e GIEMSA non escludono la diagnosi di mastocitoma, per esempio in quelli poco differenziati.

L'anticorpo CD117/cKIT viene utilizzato in immunistochemica come marker per l'origine mastocitica e l'eventuale pattern di positività individuato, in caso di mastocitoma cutaneo o sottocutaneo, fornisce informazioni prognostiche.

Similmente, KI67 è un indice di proliferazione e viene suggerito a fini prognostici.

**Melanoma:** la colorazione istochimica Fontana-Masson evidenzia la melanina e viene suggerita in neoplasie di sospetta origine melanocitaria poco/non pigmentate per ottenere conferma della diagnosi.

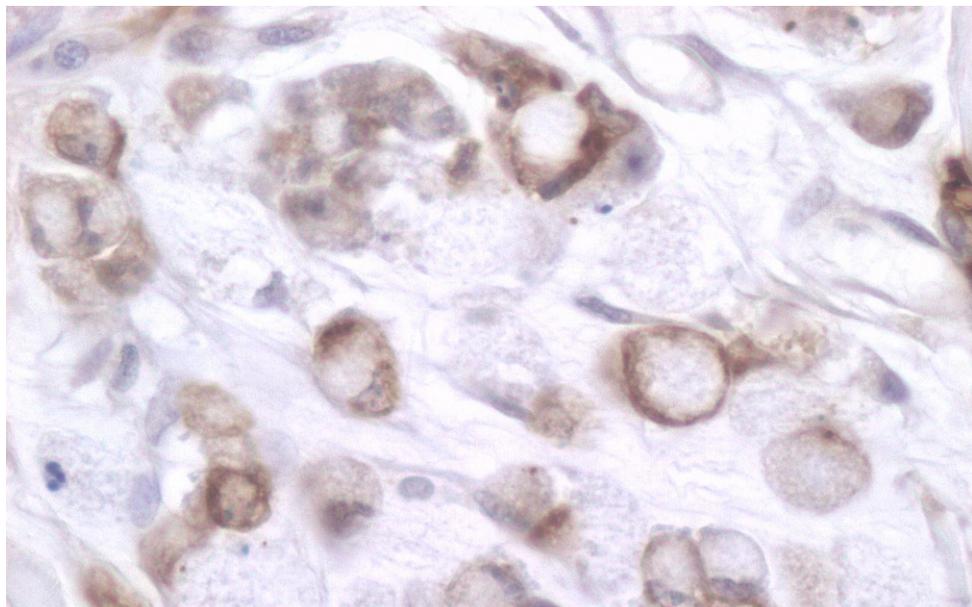
Sono molteplici invece i marker immunoistochimici che nel tempo si sono utilizzati per indicare l'origine melanocitica di neoplasie non pigmentate. Attualmente i più utilizzati sono PNL2 e Melan A. Nel nostro laboratorio, il Melan A è incluso nell'anticorpo "Melanoma Triple Cocktail" che include anche altri due anticorpi meno noti. Secondo la letteratura, l'utilizzo combinato di PNL2 e Melan A, permette di avere una sensibilità superiore al 95% nell'identificazione dei melanomi.

Nota bene: una piccola percentuale di melanomi non pigmentati (in genere a cellule fusate) è negativo per entrambe le colorazioni e pertanto non è diagnosticabile a seguito dell'esame immunohistochimico.

KI67 è un indice di proliferazione e viene suggerito a fini prognostici.

CSPG4 viene proposto perché la sua valutazione è utile in caso di terapia elettrovaccinale sperimentale (Piras et al. Vet Comp Oncol. 2017 Sep;15(3):996-1013).

**Neoplasie epiteliali:** le molecole che si utilizzano per l'identificazione immunohistochimica dell'istogenesi epiteliale sono le citocheratine. Esistono numerose citocheratine (filamenti intracellulari), alcune presenti in molte cellule di origine epiteliale (citocheratine AE1/AE3 o pancitocheratina), mentre altre sono specifiche per una o poche linee epiteliali (es. Citocheratina 7: alcuni epiteli ghiandolari ed epitelio uroteliale; Citocheratina 14: epitelio basale).



*Figura 4 – Esempio di applicazione di una colorazione per citocheratine per identificare definitivamente cellule metastatiche poco differenziate, in una lesione cutanea di cane.*

## Altri

**Neoplasie endocrine/neuroendocrine:** Sinaptofisina e Chromogranina A

**Neoplasie tiroidee:** a seconda dell'origine cellulare sono variabilmente positive per Calcitonina, TTF-1 (thyroid transcription factor-1); Tireoglobulina.

**Plasmocitoma:** MUM1

**Origine istiocitica:** CD18 (è un marker "panleucocitario" quindi saranno positivi anche altri leucociti quali i linfociti), IBA1 (specifico per istiociti/macrofagi).

**Origine muscolare:** actina muscolo liscio (SMA), desmina (muscolo striato), e molti altri che identificano varie molecole delle cellule muscolari.

**Origine endoteliale:** fattore VIII, CD31

**Origine miofibroblastica:** calponina

## IMPORTANTE

Le tecniche immunoistochimica ed istochimica sono esami in cui il patologo **INTERPRETA** il risultato e formula delle conclusioni a seguito di un quadro complessivo, istopatologico e, possibilmente, clinico-anamnestico riferito dal veterinario curante.

L'esame immunoistochimico/istochimico di per sé non distingue tra cellula infiammatoria/reattiva/ipertrofica e neoplastica, ma è il patologo che interpreta il risultato e talvolta l'esame può non essere definitivo.

Gli esempi forniti servono per illustrare situazioni "comuni" e frequenti che indicano perchè alcune istochimiche ed immunoistochimiche siano suggerite dal patologo nel contesto di un referto istopatologico.

Gli esempi forniti **NON** rappresentano un algoritmo diagnostico a cui affidarsi richiedendo esami senza consultarsi con il patologo referente che avrà valutato il caso nel suo complesso e alla luce delle possibili diagnosi differenziali.

Gli esempi indicati **NON** rappresentano un elenco esaustivo degli anticorpi disponibili in medicina veterinaria e nello specifico dal nostro laboratorio.

**Silvia Benali**, Patologo del team MYLAV

## CHE SUCCEDA A QUESTO BIOCHIMICO? – ERRORI DA EVITARE

Ogni giorno processiamo centinaia di profili biochimici, e ogni giorno ce n'è qualcuno che mostra queste gravi alterazioni biochimiche:

1. Grave **ipocalcemia** (talvolta a livelli neppure misurabili)
2. Grave **ipomagnesiemia** (idem come sopra)
3. Grave **iperkaliemia** (spesso a concentrazioni incompatibili con la vita)
4. Grave **iposideremia**

Questo induce molti clinici a pensare: “cosa avrà di così grave questo animale” oppure “il laboratorio ha sicuramente contaminato il mio campione”... ecc.

Ebbene la risposta è molto semplice in realtà le gravi alterazioni elettrolitiche sono al 100% la conseguenza di contaminazione con EDTA, anticoagulante d'elezione per l'esame emocromocitometrico, che è un'evenienza, come già sottolineato, davvero molto frequente.

### Ma come può accadere?

Il problema si realizza appena dopo che avete prelevato il sangue in siringa da un vostro paziente. Quando si sposta il sangue dalla siringa alla provetta da emocromo, il cono della siringa stessa può venire a contatto con tracce di anticoagulante toccando la provetta più o meno inavvertitamente nella sua parte interna.

Quando successivamente trasferite il sangue residuo nella provetta da siero o con litio eparina, viene trascinata anche una piccolissima quantità di EDTA dalla prima.

Quantità minime di questa sostanza hanno il potere di chelare molto efficacemente il calcio, il ferro ed il magnesio. Inoltre, contenendo molto potassio (trattandosi di  $K_3EDTA$ ), questo elettrolita verrà invece addizionato al campione.

[Vi mostriamo un video](#) di come questo può accadere: non è poi così improbabile, no....?

**Walter Bertazzolo**, Direttore Scientifico di MYLAV  
**Ugo Bonfanti**, Direttore Sanitario di MYLAV

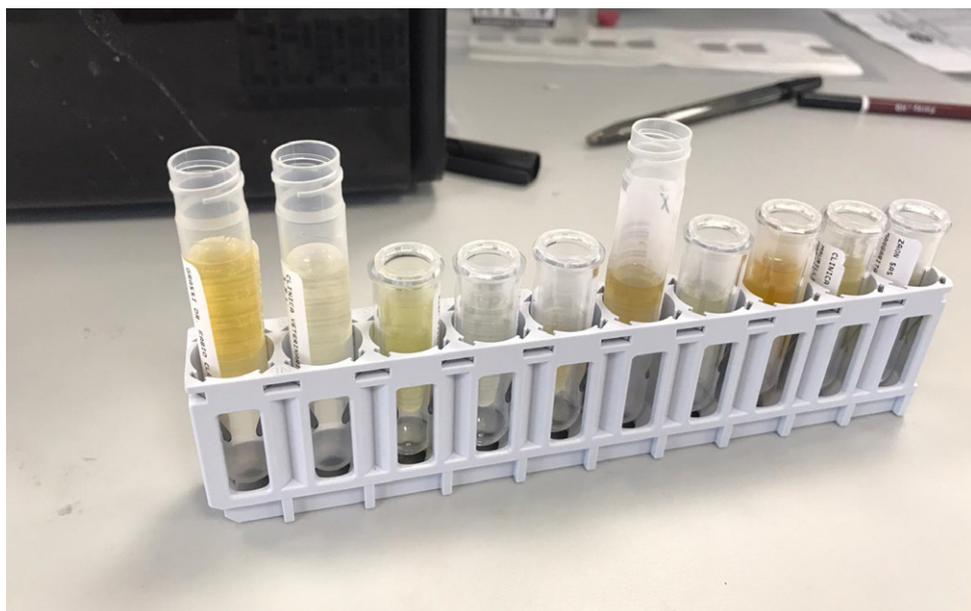
## IL TIPO DI PRELIEVO DI URINE INFLUISCE SU PROTEINURIA E CORTISOLURIA?

Che effetto può avere il prelievo di urine a casa o in clinica sulla misurazione della proteinuria e dell'escrezione del cortisolo urinario? Lo ha valutato un recente studio pubblicato sul Journal of Veterinary Internal Medicine.

Studi nell'uomo e negli animali hanno dimostrato che le condizioni stressanti possono aumentare la produzione di cortisolo e quindi anche la sua escrezione urinaria; come possibile conseguenza, anche la proteinuria può risultare aumentata in queste situazioni.

Il motivo per cui lo stress possa indurre proteinuria è probabilmente legato ad una transitoria ipertensione glomerulare ed aumentata permeabilità capillare.

L'ipercortisolismo causa comunemente proteinuria anche nel cane (ad esempio nei cani con il morbo di Cushing è un rilievo estremamente comune).





In un recente articolo pubblicato sul Journal of Veterinary Internal Medicine (Citron et al 2020: "Urine cortisol-creatinine and protein-creatinine ratios in urine samples from healthy dogs collected at home and in hospital"), è stato valutato l'effetto dello stress indotto dal viaggio verso la clinica e dall'effetto "camice bianco" su questi due analiti urinari nel cane.

Il livello di stress dei 36 cani sottoposti allo studio è stato valutato arbitrariamente dai rispettivi proprietari ed è risultato via via più alto (Casa>Viaggio>Ospedale veterinario).

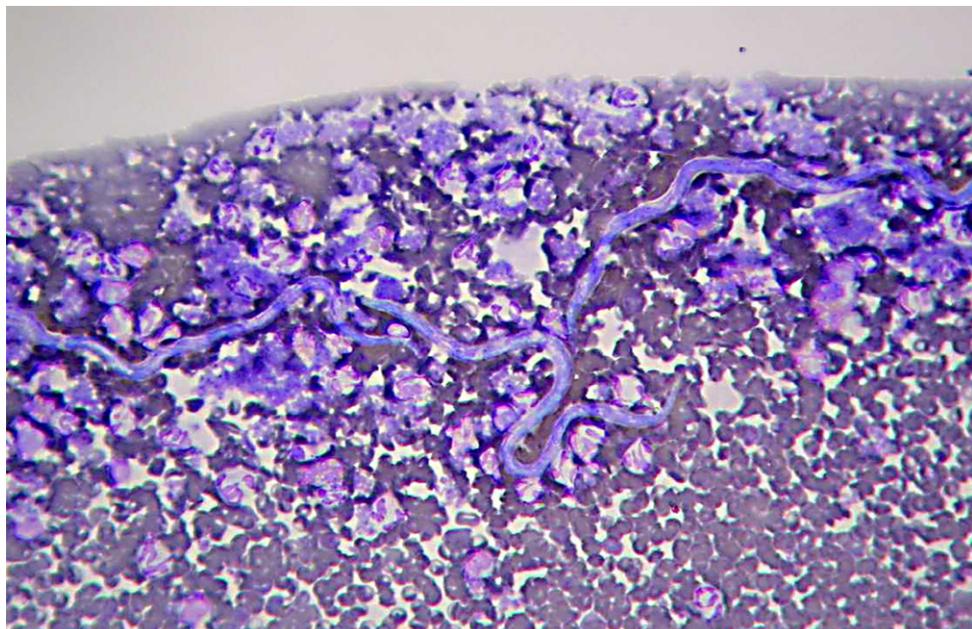
I campioni di urine sono stati ottenuti mediante minzione spontanea sia a domicilio che in clinica. Mentre i valori di proteinuria, misurati mediante il consueto rapporto PU/CU, non sono risultati significativamente differenti nei due prelievi, la cortisoloria risultava significativamente aumentata nei campioni raccolti in clinica.

Il 20% circa di questi risultava addirittura maggiore del normale intervallo di riferimento per la cortisoloria del cane. Questo aumento della cortisoloria indotto dal viaggio e dall'ambiente ospedaliero, non era infine correlabile a variazioni della proteinuria. Il principale limite dello studio, era legato al fatto che la maggior parte dei cani arruolati non erano francamente proteinurici.

Questi risultati dovrebbero ulteriormente sottolineare l'importanza della raccolta di urina a domicilio, qualora sia necessario valutare possibili stati di iperadrenocorticismi, che potrebbero essere falsamente diagnosticati in caso di urine raccolte in clinica (falso positivo dovuto allo stress).

**Walter Bertazzolo**, Direttore Scientifico di MYLAV

## COME SFRUTTARE I TEST ANTIGENICI PER LA DIAGNOSI DI FILARIOSI CARDIOPOLMONARE NEL CANE



Come vanno utilizzati ed interpretati i test per la diagnosi di filariosi cardiopolmonare nel cane? Facciamo il punto della situazione con le attuali conoscenze scientifiche.

In questa prima parte parleremo in particolare dei test antigenici su sangue periferico e della loro reale accuratezza diagnostica.

I test antigenici per la diagnosi di filariosi cardiopolmonare, oltre a essere rapidi e di facile esecuzione, sono considerati molto affidabili perché in grado di rilevare anche piccole concentrazioni di antigeni parassitari circolanti. Gli antigeni vengono liberati solo dai parassiti adulti (quindi almeno 6 mesi dopo l'infestazione), principalmente dalle macrofilarie femmine (specialmente gravide) e in concentra-

zioni molto più basse dai maschi. In presenza di un sospetto clinico fondato sono spesso indispensabili per arrivare a una diagnosi definitiva, ma sono molto utili anche per screening essendo dotati di Sensibilità e Specificità molto elevate, che in quasi tutti i test in commercio si attesta attorno al 98% per entrambi i valori.

### **Ma cosa sono sensibilità e specificità?**

La sensibilità di un test è la sua capacità di identificare correttamente gli animali malati e risponde alla domanda: “quanti, degli animali malati sottoposti al test, sono positivi?”. In termini di probabilità, la Sensibilità è la probabilità che un animale malato risulti positivo al test o la proporzione di animali malati che risultano positivi al test.

La Specificità di un test è la sua capacità di identificare correttamente gli animali sani. Rispondendo alla domanda: “quanti, degli animali sani sottoposti al test, sono negativi?”. In termini di probabilità, la Specificità è la probabilità che un animale sano risulti negativo al test o la proporzione di animali sani che risultano negativi al test. Fino a non molto tempo fa la specificità dei test antigenici per *D. immitis* era considerata essere del 100%. Da qualche tempo tuttavia sono ben note possibilità di false positività ascrivibili a reazioni crociate con altri parassiti. *Angiostrongylus vasorum*, *Spirocerca lupi*, *Dirofilaria repens* in primis, ma potenzialmente anche altre specie di nematodi (come *Acantocheilonema dracunculoides* e *Dracunculus medinensis*) e cestodi.

Da un punto di vista clinico è importante ricordarsi, quando si valuta il risultato di un test, quali sono i suoi valori di Sensibilità e Specificità. In genere sono dichiarati dal produttore e/o sono dati pubblicati da studi sull'argomento, e dovrebbero quindi essere noti prima dell'applicazione del test sulla popolazione in esame.

Al clinico però, interessa probabilmente molto di più rispondere alle seguenti domande:

- Ho fatto un test diagnostico, ed è risultato positivo: qual'è la probabilità che quel paziente abbia davvero quella patologia (nel nostro caso sia infestato da filarie)? Overo che quel risultato sia un VERO POSITIVO e non un FALSO POSITIVO?

- Ho fatto un test diagnostico, ed è risultato negativo: qual'è la probabilità che quel paziente NON abbia davvero quella patologia (nel nostro caso NON sia infestato da filarie)? Ovvero che quel risultato sia un VERO NEGATIVO e non un FALSO NEGATIVO?

Per poter rispondere a queste due domande, è necessario prendere in considerazione il Valore Predittivo, ovvero la probabilità che un soggetto positivo ad un test di screening sia effettivamente affetto da quella patologia in esame (Valore Predittivo Positivo, VPP), oppure viceversa, che uno negativo al test sia veramente non affetto dalla malattia in esame (Valore Predittivo Negativo, VPN).

Il problema più grande dei Valori Predittivi, è che a parità di test diagnostico e di performance ben stabilite in termini di Sensibilità e Specificità, essi invece variano in base alla prevalenza della patologia in quella specifica popolazione in esame: in sostanza in una popolazione dove la prevalenza della filariosi è elevata, un valore positivo al test è molto più probabile che sia un Vero Positivo che un Falso Positivo. Viceversa in una popolazione con bassa prevalenza della filariosi, la probabilità di un Falso positivo è nettamente più alta. La comprensione di questa relazione è facilitata dalla tabella sottostante che evidenzia, utilizzando un test antigenico con Sensibilità e Specificità del 98%, i diversi Valori Predittivi in relazione alla prevalenza della Filariosi.

Prevalence	Positive Predictive Value	Negative Predictive Value
0.5	33.22%	99.99%
1.0	50.00%	99.99%
1.5	60.12%	99.98%
2.0	66.89%	99.98%
2.5	71.74%	99.97%
3.0	75.38%	99.97%
4.0	80.49%	99.96%
5.0	83.90%	99.95%
6.0	86.34%	99.94%
7.0	88.17%	99.92%

Come si può osservare, il Valore Predittivo Positivo in corso di screening in un'area con prevalenza di Filariosi cardiopolmonare vicina all' 1%, in caso di positività del test è circa del 50%. Ossia la probabilità che sia un Vero Positivo o un Falso Positivo sono 50% e 50% essendo la percentuale di veri positivi sovrapponibile alla percentuale attesa di falsi positivi al test.

Per incrementare il Valore Predittivo Positivo del test antigenico, è consigliabile eseguire contemporaneamente un altro test biologicamente diverso, che si basi, cioè su altra metodologia diagnostica. Nel caso della Filariosi cardiopolmonare il test di Knott. Un eventuale positività al test di Knott confermerebbe al 100% la diagnosi.

Per questo motivo le linee Guida ESDA (European Society of Dirofilariosis and Angiostrongylosis) e AHS (American Heartworm Society), raccomandano di eseguire sempre contemporaneamente i 2 test per incrementarne i Valori Predittivi Positivi e Negativi.

Altri test quali PCR su sangue non trovano applicazione in questo contesto. La PCR ricerca il DNA contenuto nelle microfilarie circolanti (gli adulti non eliminano DNA ma solo antigeni), con una sensibilità molto più bassa rispetto al test di Knott, poiché esamina volumi ematici circa 5 volte inferiori. In caso di microfilaremie con livelli di microfilarie pari o inferiori a 5-6 larve/ml è molto spesso falsamente negativa. Non ha alcun senso quindi eseguirla in caso di negatività al test di Knott.

Qualora non sia possibile eseguire un test di Knott, pur essendo molto semplice, rapido ed economico, è possibile effettuare la ricerca ed identificazione morfologica delle microfilarie con valutazione di uno striscio ematico con colorazione rapida (Romanowsky), che presenta sensibilità e specificità, se l'identificazione morfologica è effettuata correttamente, pari a quella della PCR ma con costi decisamente inferiori.

In conclusione i test antigenici per *Dirofilaria immitis* sono fondamentali per la diagnosi ma devono essere interpretati in relazione al loro uso. In caso di positività non confortata da un dato anamnestico (area a bassa prevalenza, proprietari che hanno effettuato chemioprolifassi, soggetti vicini ai 6 mesi di età), di laboratorio (Test di Knott negativo) o di diagnostica strumentale (mancata visualizzazione di macrofilarie in corso di ecocardiografia), prima di emettere una diagnosi e ancor più effettuare un trattamento, è indispensabile escludere false positività legate a reazioni crociate, in primis da *Angiostrongylus vasorum* e *Dirofilaria repens*.

Parleremo ancora di filariosi nella prossima puntata del nostro blog, a presto.

**Luigi Venco**, Dipl. EPVC, Esperto MYLAV

## **OPS – L'ACTH MI È USCITO FUORI VENA... CHE FACCIAMO CON IL MIO TEST DI STIMOLAZIONE?**

State eseguendo un test di stimolazione con ACTH e avete deciso di farlo per via EV, ma al momento di iniettarlo, vi accorgete che il farmaco è uscito nel sottocute e nei tessuti perivascolari.

### **Cosa succede? Dovremo ripetere il test nuovamente? E dopo quanto?**

Questa eventualità può capitare a chiunque decida di fare l'iniezione di ACTH per via endovenosa. La domanda che sorge spontanea a chiunque è: dovrò quindi rifare il test, perché non posso essere certo dell'assorbimento adeguato dell'ormone e quindi dell'affidabilità del test. Oppure no?

Dato che questo piccolo inconveniente è capitato proprio ad un cane di amici, mi sono interessato all'argomento. Ecco cosa ho riscontrato.





In un articolo pubblicato sul Journal of Veterinary Internal Medicine (Johnson et al; Effect of intravenous or perivascular injection of syntetic ACTH on stimulation test in dogs; JVIM 2017), gli autori hanno studiato l'effetto di una corretta somministrazione endovenosa di ACTH con una in sede perivascolare. Lo studio è stato condotto su 10 cani sani e 10 cani con sindrome di Cushing in fase di monitoraggio terapeutico. Tutti i cani hanno effettuato il test di stimolazione con ACTH con entrambe le metodiche di somministrazione (endovenosa e perivascolare), a distanza di alcuni giorni una dall'altra.

Ebbene la modalità di somministrazione dell'ACTH non ha avuto alcun effetto significativo sui risultati del test. Possiamo quindi affermare che, in caso di errore di somministrazione endovenosa, potete considerare affidabili comunque i risultati del test di stimolazione che avete effettuato.

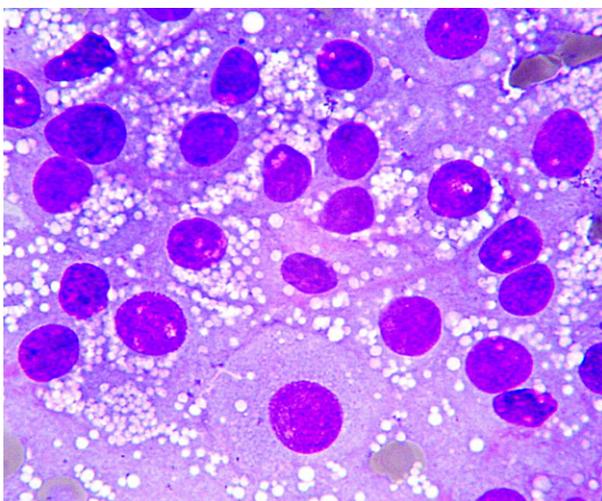
**Walter Bertazzolo**, Direttore Scientifico di MYLAV  
**Federico Fracassi**, Esperto MYLAV di endocrinologia

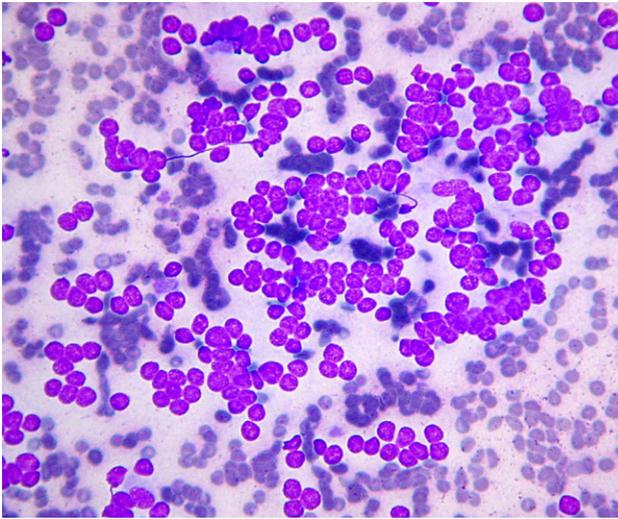
## L'ASPIRAZIONE DELLE LESIONI SURRENALICHE È RISCHIOSA?

La diagnosi definitiva delle neoplasie surrenaliche, necessita purtroppo una valutazione istologica. Gli aspetti clinici, i dosaggi ormonali e i rilievi di diagnostica per immagini possono ovviamente indirizzare verso un incidentaloma non secernente, un tumore secernente adrenocorticale, un feocromocitoma o una metastasi. Tuttavia la conferma definitiva richiede una biopsia. L'esame citologico ha dimostrato una elevata accuratezza nella distinzione di neoplasie corticali VS midollari. Ma quanto è rischioso farlo?

Storicamente, l'esecuzione di biopsie citologiche (o peggio, mediante tru-cut) delle neoformazioni surrenaliche, è stato tacciato come procedura molto rischiosa. In molti libri di oncologia clinica veterinaria viene altamente sconsigliato. Ciò deriva da esperienze della medicina umana, che hanno registrato eventi avversi molto gravi e talora fatali, nei casi in cui la massa campionata fosse un feocromocitoma. Queste complicazioni possono andare dal dolore post-FNA, a fenomeni emorragici più o meno gravi, fino a shock, difficoltà respiratoria, crisi ipertensive e morte. Se si valuta tuttavia la letteratura in maniera critica, si rileva come questi dati derivino in realtà solo da sporadici case-report più che da studi più solidi.

L'esame citologico delle neoformazioni surrenaliche d'altra parte ha dimostrato una elevata accuratezza (90-100%) nella distinzione tra proliferazioni corticali (immagine in alto) e midollari-feocromocitoma (immagine in basso). Sebbene non permetta con certezza di differenziare forme maligne da benigne, il conoscere anticipatamente se una neoplasia sia corticale o midol-





lare, permette al clinico di prendere possibili precauzioni in caso di chirurgia, che potrebbe scatenare crisi ipertensive nel caso di un feocromocitoma.

In un recentissimo articolo pubblicato sul Journal of Veterinary Internal Medicine (Pey et al; Safety of percutaneous ultrasound-guided fine-needle aspiration of adrenal lesions in dogs: perception

of the procedure by radiologists and presentation of 50 cases; JVIM 2020), gli autori hanno cercato di valutare quale fosse la percezione del rischio di tale procedura da parte dei radiologi Board-certified al college Europeo o Americano.

Un totale di 138 radiologi hanno risposto al questionario: circa 2/3 dei radiologi ha risposto di non effettuare la procedura in quanto ritenuta troppo rischiosa o non utile ad aggiungere informazioni vantaggiose per la gestione del caso clinico.

Per i radiologici che invece hanno risposto di effettuare più o meno regolarmente il campionamento, è stato registrato un tasso di complicanze dell'8% (in prevalenza emorragie di grado moderato), di cui solo il 2% gravi, con morte del paziente il giorno successivo all'aspirazione. Tuttavia, il solo cane deceduto sembra che abbia avuto un outcome sfavorevole a causa di una paralisi laringea. Nessuna crisi ipertensiva è stata registrata dopo l'FNA. Le dimensioni dell'ago o la tipologia di prelievo (aspirazione VS infissione) non hanno mostrato differenze in termini di rischio.

Complessivamente lo studio conferma quanto già recentemente pubblicato in un altro lavoro (Sumner et al. Clinical safety of percutaneous ultrasound-guided fine-needle aspiration of adrenal gland lesions in 19 dogs. J Small Anim Pract.



2018), in cui sono state osservate complicazioni post-FNA in 1 su 23 campionamenti citologici surrenalici.

Questa incidenza non è in sostanza molto diversa a quella osservabile in campionamenti di altri organi intra-cavitari.

Indipendentemente dall'utilità che possa avere il risultato della citologia ed il suo impatto sulla gestione del caso clinico, sulla quale non esiste ancora un accordo tra i clinici/endocrinologi, la procedura di FNA delle masse surrenaliche del cane può pertanto essere considerata non più rischiosa di altre.

**Walter Bertazzolo**, Direttore Scientifico di MYLAV

## **PARR: ISTRUZIONI E AGGIORNAMENTI PER UN CORRETTO UTILIZZO**

La PARR è una tecnica molecolare recentemente sviluppata in medicina veterinaria, per la diagnosi di neoplasia linfoide o di condizione reattiva: facciamo il punto della situazione con questo aggiornamento dei nostri esperti.

La diagnosi differenziale tra una malattia linfoide reattiva e neoplastica nel cane e nel gatto può essere complicata in alcuni pazienti e, data la diversa prognosi e trattamento, una diagnosi corretta diventa spesso cruciale. Il test di clonalità (PARR), che valuta la variabilità del riarrangiamento genico dei recettori dell'antigene linfocitario, può essere un valido strumento per integrare l'interpretazione citologica, istologica ed immunohistochimica, allorquando queste non risultino conclusive.

Cerchiamo di fare un po' di chiarezza sulla metodica e un aggiornamento rispetto ad un nostro precedente post su questo blog.

### **Che cosa è la PARR?**

È una tecnica di biologia molecolare (PCR) attraverso cui si analizzano i riarrangiamenti genici delle cellule linfoidi a livello delle regioni VDJ dei geni delle immunoglobuline (IG) dei linfociti B e del recettore specifico dei linfociti T (T-Cell Receptor).

### **Che cosa è il riarrangiamento delle IG e del TCR?**

I geni delle IG e del TCR contengono diversi segmenti genici V, D, e J che vengono riarrangiati in modo casuale durante le fasi iniziali del processo di crescita e differenziazione dei linfociti, conferendo una grande variabilità genetica, al fine di garantire un'elevata capacità da parte dei recettori dei linfociti B e T di riconoscere l'antigeni molto differenti.

## **Perché si chiama PARR?**

PARR è l'acronimo di "PCR for antigen receptor rearrangements".

## **Su quale substrato viene svolta la PARR?**

Il test di clonalità si esegue utilizzando il DNA genomico estratto da tessuti fissati in formalina e inclusi in paraffina per l'esame istologico. Inoltre, può essere ottenuto da preparati citologici, anche colorati, e versamenti. Il tessuto fresco o congelato rappresenta un substrato adeguato.

## **I diversi substrati possono influire sul risultato finale della PARR?**

Sì. Il DNA genomico estratto dai preparati citologici e dai versamenti è spesso scarso e di bassa qualità. Inoltre, le cellule linfoidi presenti nel campione citologico possono non essere rappresentative dell'intera lesione, causando un errore interpretativo della PARR (soprattutto falsi negativi). In linea generale, non si consiglia di eseguire la PARR su preparati citologici e versamenti, soprattutto senza immunofenotipizzazione. I campioni inviati per l'esame istologico, di solito maggiormente rappresentativi della lesione, sono invece più adeguati per questo tipo di analisi.

## **A che cosa serve la PARR?**

In teoria, permette di distinguere tra processi reattivi/infiammatori a componente linfocitaria (policlonali) e processi neoplastici linfoidi (monoclonali).

## **La PARR è un test definitivo per la diagnosi?**

No, per definizione i risultati della PARR (profili di elettroforesi) non sono mai diagnostici o patognomonici di un processo specifico e devono essere sempre interpretati insieme ai dati clinici, morfologici (istologia-citologia) e immunofenotipici (immunoistochimica-citofluorimetria). Pertanto, il solo test di clonalità non è definitivo.

## Posso utilizzare la PARR per identificare il fenotipo della neoplasia?

No, la PARR non dovrebbe essere considerata come tecnica diagnostica principale per determinare il fenotipo (B o T). Altri strumenti, come la citofluorimetria, l'esame immunohistochimico e l'esame immunocitochimico sono i test indicati per determinare il fenotipo di una neoplasia linfoide.

## Quando richiedo la PARR?

Posso richiedere la PARR dopo un'adeguata raccolta di dati clinici-anamnestici, campionamento/i per esame citologico ed istologico ed esame immunohistochimico. Il laboratorio, essendo già in possesso del campione di tessuto in paraffina, potrà eseguire la PARR a seguito della richiesta di aggiunta esame.

## Quali sono e come interpreto i risultati della PARR?

I profili di elettroforesi sono classificati in diverse categorie rappresentate da schemi archetipici (Figure 1-4):

- **Clonale:** solitamente è indicativo di un processo neoplastico. Si rileva un prodotto singolo di amplificazione e di dimensioni attese
- **Policlonale:** solitamente è indicativo di un processo reattivo. Si rilevano diversi prodotti di amplificazione di dimensioni differenti.
- **Pseudoclonale:** può essere associato ad un processo reattivo o neoplastico. Si rileva un picco clonale non ripetibile in due diversi replicati.
- **Nessun prodotto specifico:** può essere associato ad un processo reattivo o neoplastico. Non viene rilevato nessun prodotto di amplificazione.

## CLONALE

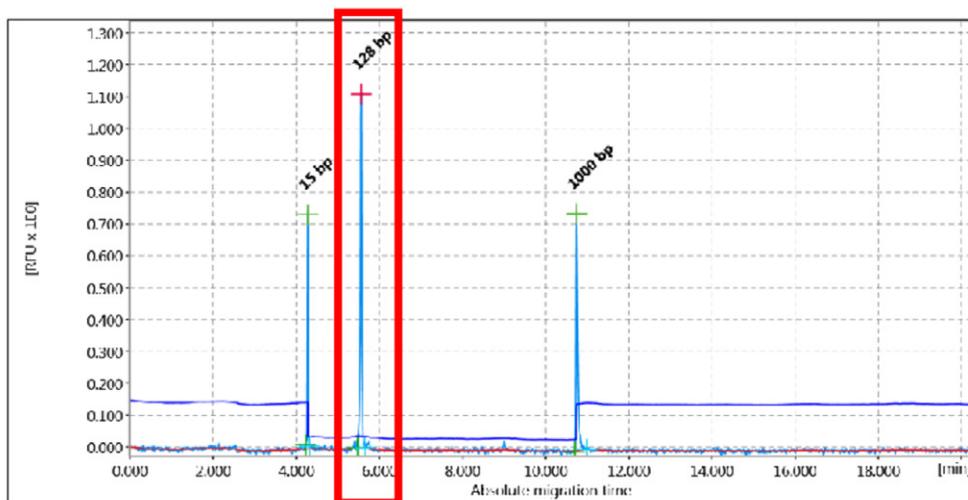


Figura 1 – Esempio di amplificato monoclonale delle dimensioni attese.

## POLICLONALE

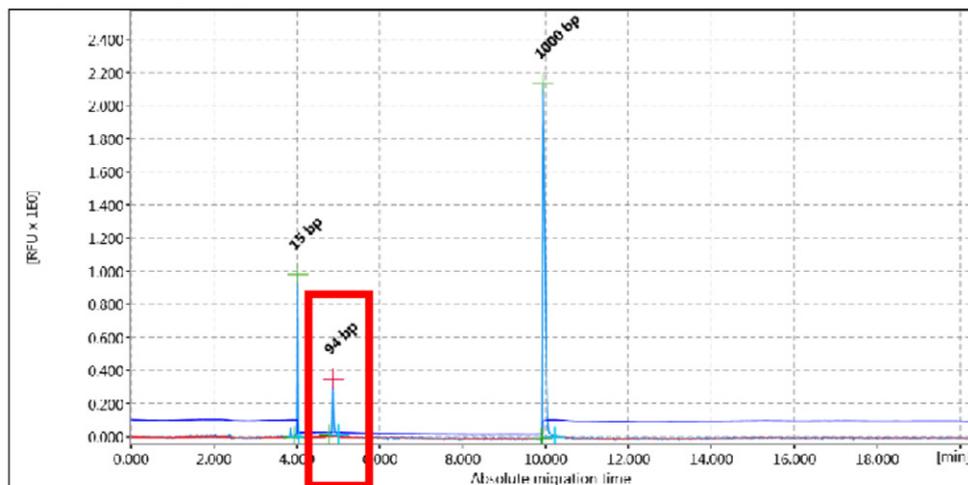
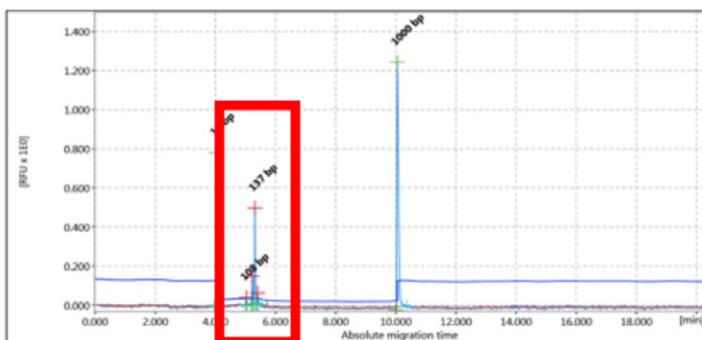
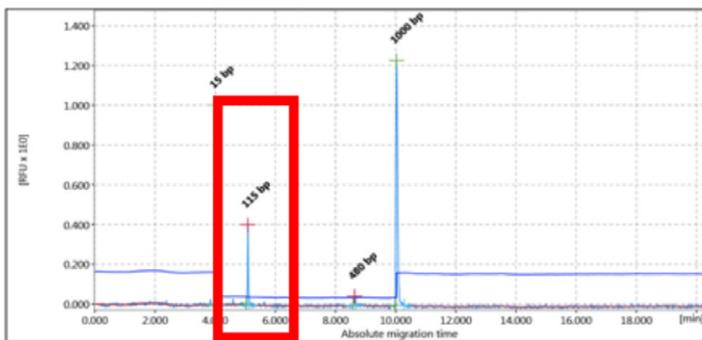


Figura 2 – Esempio di amplificati policlonali multipli e di piccole dimensioni.

## PSEUDOCLONALE



Replica 1



Replica 2

Figura 3 – Esempio di amplificati monoclonali non ripetibili in due diverse amplificazioni (uno di 137 pb e l'altro di 115 pb).

## NESSUN PRODOTTO SPECIFICO

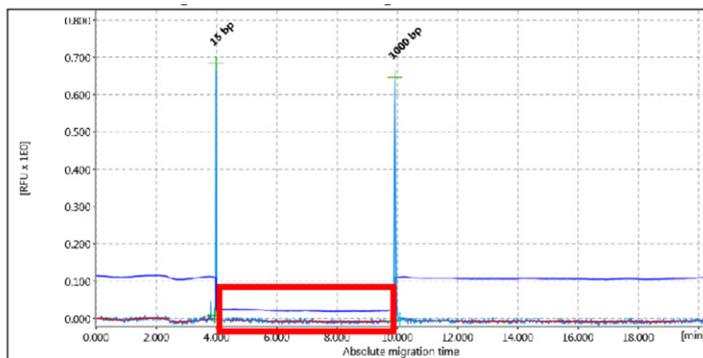
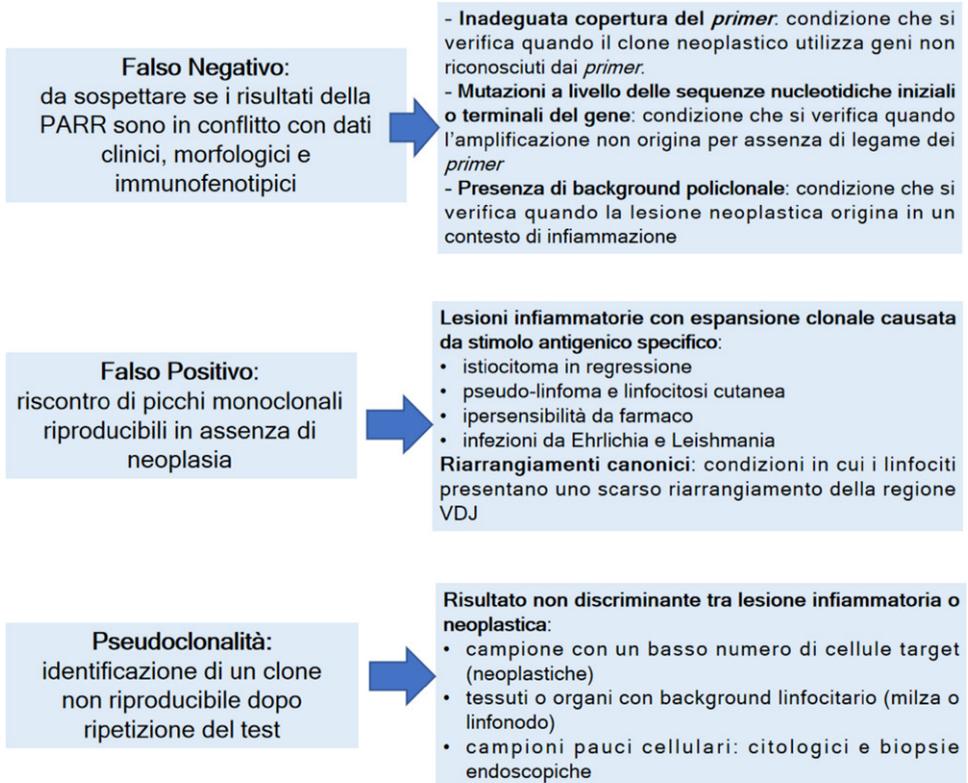


Figura 4 – Esempio di amplificato negativo (non si osservano prodotti di amplificazione).

## Ci sono dei limiti?

Diversi aspetti tecnici e biologici influiscono su sensibilità e specificità della PARR, dando esito a risultati negativi, falsi positivi o formazione di prodotti pseudoclonali. Nelle immagini schematiche seguenti sono elencate le cause principali:



**Michele Marino**, Biologo Molecolare di MYLAV

**Luca Aresu**, Patologo, Esperto MYLAV

**Walter Bertazzolo**, Direttore Scientifico di MYLAV

## **COME PREPARARE I PEZZI CHIRURGICI PER LA VALUTAZIONE DEI MARGINI DI ESCISSIONE**

In oncologia, la valutazione istologica dei margini di escissione chirurgica è fondamentale per il corretto iter terapeutico e per la prognosi. Per essere valutati accuratamente, ci deve essere una stretta collaborazione tra clinico/chirurgo oncologo e patologo. Ai primi spetta il compito di eseguire appropriatamente la procedura chirurgica e segnalare correttamente i margini di escissione, ai secondi invece di processare il campione con procedure standard variabili da caso a caso. Ne parliamo approfonditamente in questo post.

L'esame istologico per la valutazione dei margini chirurgici risulta essere un ausilio fondamentale per il clinico, in quanto permette di stabilire se la neoplasia sia stata escissa in toto o meno. Nel caso in cui i margini risultino infiltrati, è importante stabilire dove si estenda la neoplasia e procedere, ove possibile, con "curettage" chirurgico o ulteriori interventi terapeutici mirati (es. radioterapia). Affronteremo l'argomento con l'ausilio di alcuni esempi pratici e disegni schematici.

### **I NODULI/NEOFORMAZIONI CUTANEE**

I margini chirurgici dei tumori cutanei asportati in toto vengono sempre valutati in ogni sezione istologica disponibile. Tuttavia la misura dell'estensione della neoplasia è limitata solo alle due sezioni trasversali che vengono preparate per ottenere la diagnosi (tecnica del cross sectioning – fig. 1). Al contrario, la valutazione dei margini completa si ottiene attraverso l'esame di tutto il margine perimetrale del campione ottenuto con l'exeresi chirurgica, ma risulta essere un processo più complesso e costoso, da richiedersi in fase di accettazione al laboratorio (tecniche dei margini perimetrali- fig. 2°, e di bread Bologna slicing – fig. 2B).

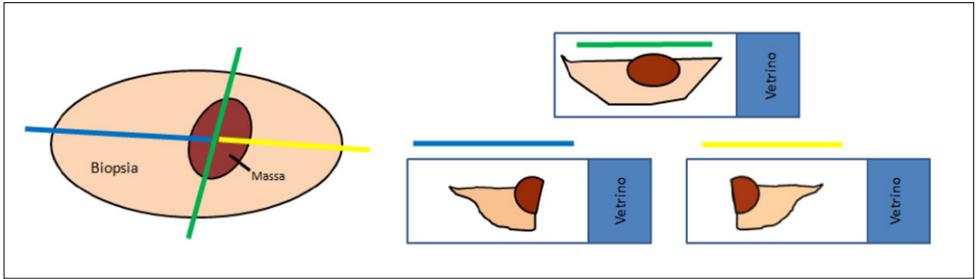


Figura 1 – Tecnica del sectioning.

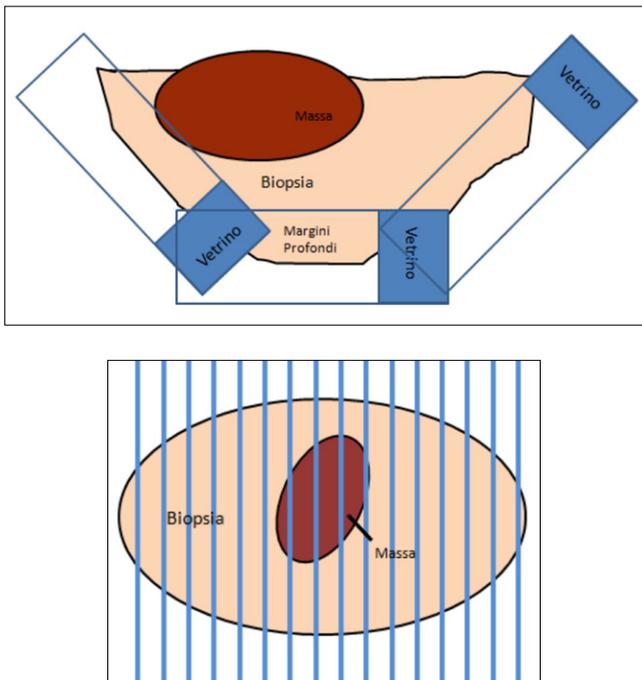


Figura 2 – In alto, margini tangenziali /perimetrali; in basso, tecnica bread Bologna slicing.

Come possiamo segnare il margine chirurgico nel campione istologico inviato al laboratorio? Possono essere utilizzate diversi approcci:

1) il più semplice, ma probabilmente il più costoso, è rappresentato dall'inchiostro chirurgico (inchiostro speciale che resiste alla processazione). L'applicazione dell'inchiostro deve avvenire in tempi rapidi sul campione chirurgico, entro massimo 30 minuti dall'escissione. Per evitare che l'inchiostro si diluisca durante la fissazione deve essere lasciato asciugare completamente (circa 5-10 minuti) prima di fissare il tessuto in formalina. La presenza di inchiostro indelebile sul margine, permette all'istopatologo di riconoscere la sede di escissione chirurgica all'esame microscopico (fig.3). Per quanto riguarda i campioni chirurgici di cute-sottocute, nel caso si utilizzino colori di china differenti, è opportuno segnalare ogni margine con le diverse tonalità e riportare le corrispondenze sulla scheda di accompagnamento. Nel caso si utilizzi un solo colore, solitamente si procede con la marcatura del margine profondo utilizzando anche un punto di sutura su uno dei margini (laterali / dorso-ventrali / cranio-caudali) per favorire l'orientamento del pezzo chirurgico.

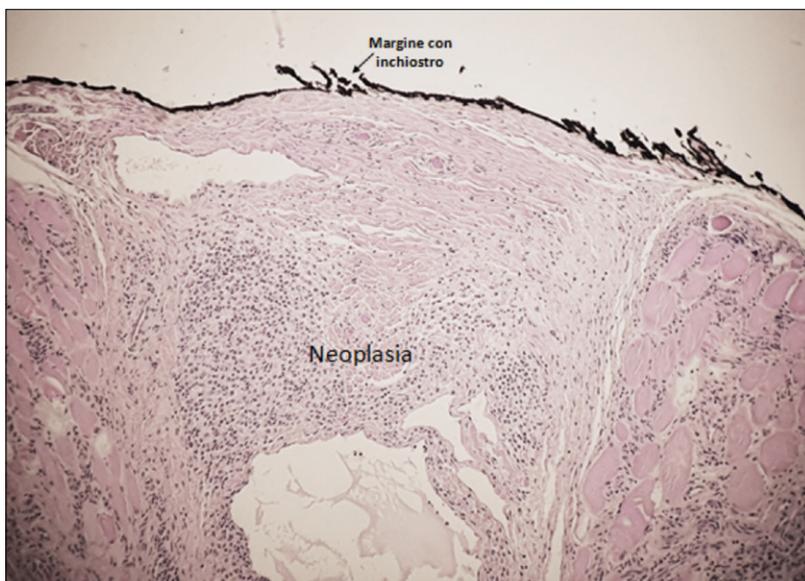


Figura 3 – Margine di escissione identificato dall'inchiostro chirurgico all'esame istologico.

2) In assenza di inchiostro chirurgico si possono utilizzare solo i punti chirurgici per contrassegnare almeno un margine della neoformazione. È preferibile non usare graffette metalliche perché possono causare problemi successivamente al taglio del pezzo con il microtomo in laboratorio.

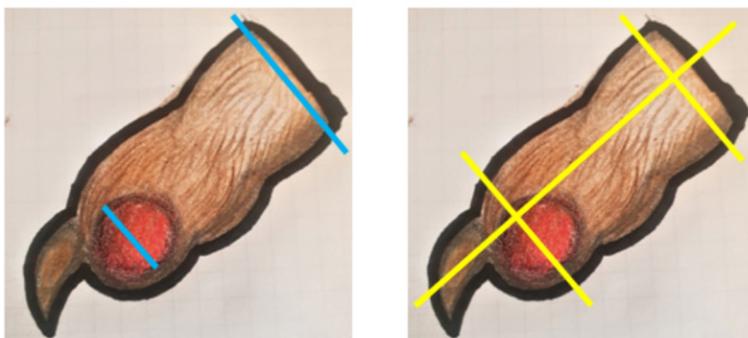
I margini contrassegnati dovranno essere segnalati accuratamente sulla scheda di richiesta inviata al laboratorio.

Di seguito le modalità di studio dei margini chirurgici in altri distretti, organi e apparati.

## DITA

Come si osserva in figura 4, l'amputazione digitale prevede, in fase di trimming, due passaggi:

1. Prima della fase di decalcificazione, necessaria per i campioni costituiti da tessuto osseo, si prelevano sezioni di tessuto molle della massa e due sezioni per i margini molli chirurgici.
5. Dopo aver atteso il corretto tempo per la decalcificazione, si seziona il campione digitale perpendicolarmente, attraverso il letto ungueale e, se necessario, si esegue una sezione frontale attraverso la falange. È necessario inchiostrare il margine prossimale dell'amputazione sia cutaneo sia osseo.

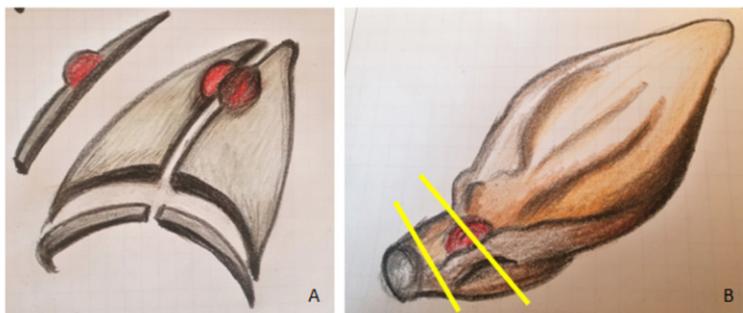


*Figura 4 – Margini a carico del dito (a sinistra sezioni dei tessuti molli, a destra sezioni post-decalcificazione).*

## ORECCHIO

1. A) Resezione distale parziale della pinna: si esegue una sezione perpendicolare della neoformazione e una sezione trasversale lungo il margine (fig. 5 A).
6. B) Ablazione totale del condotto uditivo (TECALBO), per l'escissione dei tumori maligni nel condotto uditivo: si esegue una sezione trasversale della massa e una sezione trasversale del campione a livello del margine chirurgico (fig. 5 B).

È opportuno utilizzare l'inchiostro sulla faccia marginale cutanea o del canale auricolare.

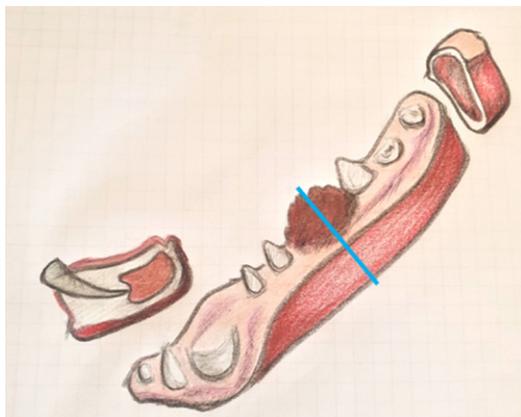


*Figura 5 – Margini a carico del padiglione auricolare/orecchio.*

## MANDIBOLA /MASCELLA:

Prima del processo di decalcificazione, se possibile, si esegue una sezione della neoformazione. In seguito, si analizzano i margini ossei cranio-mediali e caudali con una sezione parallela e si esegue una sezione totale della parte comprendente la massa (fig.6).

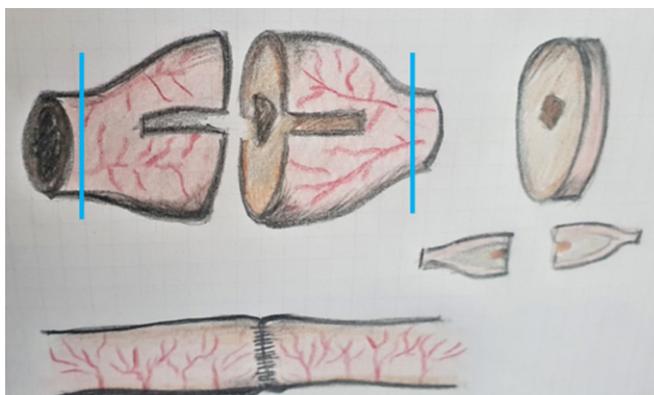
È opportuno utilizzare l'inchiostro a livello dei margini caudali e mediali del pezzo operatorio.



*Figura 6 – Margini per mandiblectomia/maxillectomia.*

## **ORGANI CAVI**

L'esame dei margini di resezione intestinali (o di organi cavi tubulari) comprende una sezione parallela di ciascuno dei margini chirurgici (prossimale e distale) e una o più sezioni della neoformazione (fig. 7). In questo caso non è necessario l'utilizzo di inchiostro ma un punto di sutura su uno dei margini (prossimale o distale, da identificare sulla scheda di accompagnamento) per l'orientamento del pezzo operatorio.



*Figura 7 – Margini di organi cavi.*

## ORGANI PARENCHIMATOSI

Anche nel caso degli organi parenchimatosi l'esame dei margini viene eseguito attraverso una sezione parallela dei margini chirurgici e una o, se necessario, più sezioni della neoformazione (fig. 8).

È opportuno utilizzare l'inchiostro sul margine di escissione (freccia blu in figura) per una più precisa valutazione marginale.



*Figura 8 – Organi parenchimatosi.*

## VALUTAZIONE DEI MARGINI ISTOLOGICI DA PARTE DEL PATOLOGO

Il patologo nel suo report finale, infine, inserisce l'entità del margine pulito nella descrizione, specificando (dove possibile) la misura in mm. Recentemente Liptak et al (2020) hanno proposto lo schema R utilizzato in medicina umana, il quale definisce diversi gradi di infiltrazione dei margini. Tuttavia tale schema classificativo deve ancora essere validato in medicina veterinaria:

- $R0 \leq 1$  mm
- $R0 > 1$  mm
- R0 (un)
- R1 (is)
- R2a, R2b e R2c

dove R0 è esente, R0 (un) si riferisce ad un'escissione istologica completa ma con stadiazione clinica incompleta, R1 (is) è la presenza di tumore in situ al margine chirurgico e R2a, R2b e R2c identificano una malattia locale residua, malattia metastatica residua e malattia residua in entrambi i siti (Liptak 2020)

**Selina Iussich & Luca Aresu** – Università di Torino

### **Riferimenti bibliografici:**

Kamstock, D. A., Ehrhart, E. J., Getzy, D. M., Bacon, N. J., Rassnick, K. M., Moroff, S. D., Kiupel, M. (2010). Recommended Guidelines for Submission, Trimming, Margin Evaluation, and Reporting of Tumor Biopsy Specimens in Veterinary Surgical Pathology. *Veterinary Pathology*, 48(1), 19–31.

Liptak, J. M. (2019). Histologic Margins and the Residual Tumour Classification Scheme: Is It Time to Use a Validated Scheme in Human Oncology to Standardize Margin Assessment in Veterinary Oncology? *Veterinary and Comparative Oncology*.

DJ Meuten. *Tumors in domestic animals*. V edition. Wiley Blackwell, 2017

Milovancev, M., & Russell, D. S. (2017). Surgical margins in the veterinary cancer patient. *Veterinary and Comparative Oncology*, 15(4), 1136–1157.

## **COME EFFETTUARE UN CORRETTO CAMPIONAMENTO PER L'ESAME TRICOSCOPICO E LE SUE FINALITÀ**

L'esame tricoscopico è una metodica diagnostica utilizzata in dermatologia. Viene utilizzata per lo studio della struttura dei peli e per la valutazione di malattie che si presentano con alopecia. Vediamo nei dettagli come si esegue e a cosa serve con il nostro esperto Federico Leone.

### **Metodica di campionamento dei peli**

Per un corretto campionamento, i peli vanno afferrati alla base, in corrispondenza dell'emergenza dell'ostio follicolare e strappati rispettando sempre il loro senso di crescita per evitare fratture che impediscano di estrarne la porzione follicolare.

Per l'estirpazione dei peli si utilizza una pinza emostatica Mosquito con le punte diritte o curve. È consigliabile ricoprire le branche della pinza con due tubicini di gomma (può essere utilizzato anche il tubicino della butterfly), per evitare di danneggiare i peli e causare artefatti, e per ottenere, contemporaneamente, una presa migliore sui fusti piliferi.



*Figura 1 – Esempio di procedura di prelievo di peli per esame tricoscopico.*

Alcuni clinici preferiscono prelevare i peli direttamente con le dita, stringendoli fermamente tra indice e pollice e utilizzando i guanti, soprattutto in caso di sospetto clinico di dermatofitosi.

È importante non strappare troppi peli alla volta per non causare fastidio all'animale.

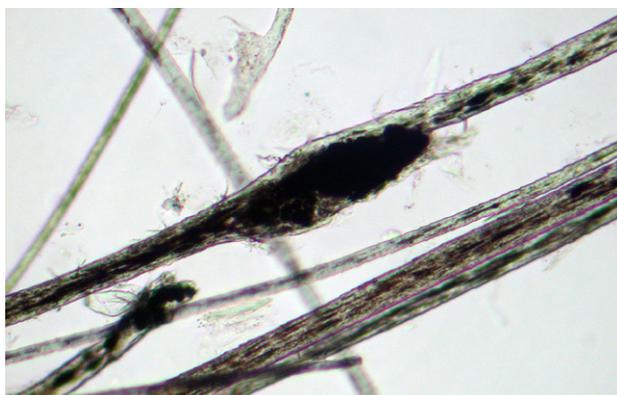
I peli devono essere strappati energicamente per essere sicuri di raccogliere un campione significativo in tutte le fasi del ciclo pilifero e non solo quelli in fase di riposo che si sfilano più facilmente, in quanto lassamente ancorati al follicolo.

Se si sospetta una dermatofitosi, si hanno maggiori possibilità di successo includendo nel preparato i peli risultati fluorescenti con la lampada di Wood.

Per inviarli al laboratorio, i peli vanno inseriti in una busta di carta da lettera per permettere all'operatore di raccogliarli con facilità. Va evitato il materiale in plastica, in quanto rende difficile la raccolta dei peli che tendono ad aderire alla superficie di plastica del contenitore.

### **Finalità dell'esame tricoscopico**

L'esame tricoscopico permette di valutare la fase del ciclo follicolare, le alterazioni morfologico-strutturali dei peli e la presenza di parassiti e di dermatofiti.

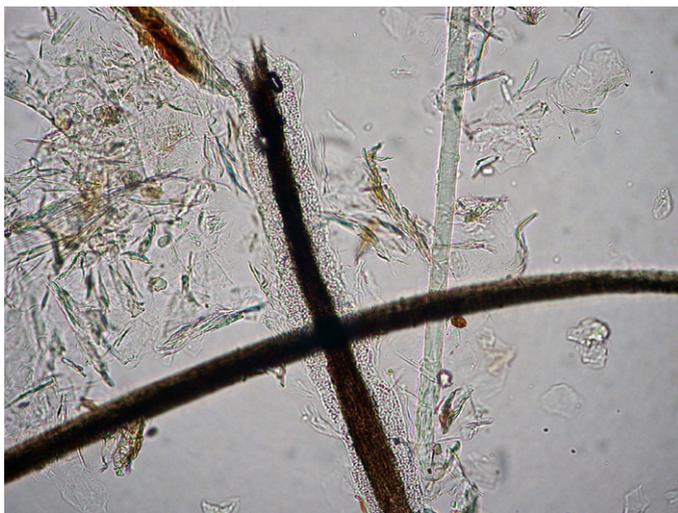


*Figura 2 – Esame tricoscopico di un cane con alopecia diffusa: aggregato di melanosomi che deforma il fusto pilifero.*

Lo studio delle radici permette di valutare la presenza di un'alterazione del rapporto anagen/telogen (come si verifica nelle endocrinopatie, nel deflusso telogeno o nell'alopecia post tosatura) o una quantità eccessiva di materiale cheratinico (come si osserva nei disturbi follicolari o nei disturbi della cheratinizzazione come, ad esempio l'adenite sebacea).

Le radici possono essere malformate, unitamente al fusto pilifero, per alterazioni della pigmentazione (come si osserva nell'alopecia del mantello diluito o in quella dei peli neri).

Il fusto pilifero può apparire destrutturato per la presenza di ife fungine e circondato da spore fungine in corso di dermatofitosi.



*Figura 3 – Esame tricoscopico di un gatto con alopecia focale: artroconi che avvolgono un pelo infetto.*

Altre malattie rare del fusto pilifero diagnosticabili con l'esame tricoscopico sono la tricomalacia, la tricoressi nodosa e i pili torti.

Le punte possono apparire spezzate come si verifica classicamente per autotraumatismo (prurito allergico o parassitario) o alterate in seguito ad eccessiva esposizione ad agenti atmosferici.

Con l'esame tricoscopico è possibile infine evidenziare la presenza di Demodex, uova di Cheyletiella e adulti e uova di pidocchi.



*Figura 4 – Esame tricoscopico di un cane con alopecia multifocale: numerosi adulti di Demodex canis.*



*Figura 5 – Esame tricoscopico di un gatto con alopecia rarefazione del mantello: uovo di pidocchio (lendingine) adesa al fusto pilifero.*

**Federico Leone**, Esperto MYLAV in dermatologia

## IL MASTOCITOMA DERMICO DEL CANE: COSA È NECESSARIO FARE

Il mastocitoma cutaneo a localizzazione dermica è una delle neoplasie più frequenti del cane. Con il progressivo incremento delle evidenze scientifiche, l'approccio a questa patologia neoplastica è cambiato decisamente nel corso degli ultimi anni. Cosa è davvero necessario fare e come dobbiamo comportarci in base a stadio clinico e grado istologico?

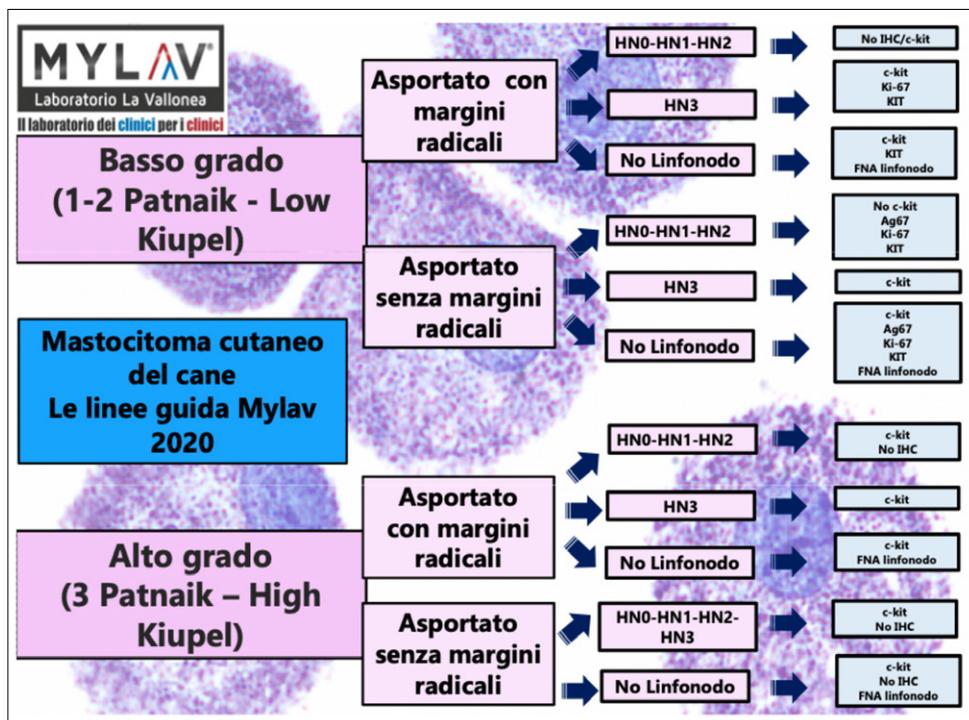


Vi diamo le attuali linee guida.

La nostra consulente in oncologia, la prof. Laura Marconato (ECVIM-Oncology Diplomate) dell'università di Bologna, in collaborazione con il team di patologi di Mylav, ha redatto un documento dettagliato ed un algoritmo semplificato, che potete scaricare liberamente, nei quali vengono indicate le linee guida più attuali per la gestione del mastocitoma dermico del cane. Con l'esempio dei vari scenari possibili, vi verranno indicate quali sono le indagini aggiuntive eventualmente consigliate e le terapie adiuvanti. Dobbiamo sottolineare che queste linee guida non sono

adatte ai mastocitomi con localizzazione sottocutanea, di cui vi parleremo invece nel prossimo post.

Alla luce delle conoscenze attuali, “mastocitoma” è una diagnosi generica. La maggior parte dei mastocitomi del cane coinvolge il derma, e viene gradato istologicamente secondo quanto descritto da Patnaik (1984) e più recentemente da Kiupel (2010).



Una parte minoritaria coinvolge invece esclusivamente il sottocute: in questo caso non si applica alcun grading.

I mastocitomi muco-cutanei rappresentano invece una categoria a sé e, parimenti ai sottocutanei, non vengono gradati.

Il grado istologico, sebbene molto importante per definire la prognosi, deve essere integrato con il dato dello stadio clinico. A questo proposito, è stato documentato che la linfadenectomia, eseguita contestualmente alla rimozione del tumore primitivo, non solo ha un importante ruolo diagnostico, ma ha anche un ruolo terapeutico. Per

questo motivo è importante che il linfonodo regionale venga identificato e rimosso, indipendentemente dalle sue dimensioni e dalla diagnosi citologica, e inviato insieme al mastocitoma primitivo in laboratorio, per il corretto inquadramento patologico.

Mettendo insieme: sede di origine + grado istologico + stadio clinico, è possibile anticipare il comportamento biologico e stabilire se il cane ha bisogno, o meno, di terapie adiuvanti.

Oggi sono disponibili moltissimi marcatori e test, che possono essere richiesti in laboratorio per perfezionare la diagnosi istopatologica e definire con maggior precisione la prognosi.

### **Ma servono davvero tutti? Cosa è indispensabile, cosa è utile e cosa è superfluo?**

Questa guida è intesa ad aiutare il clinico a orientarsi nella richiesta dei test aggiuntivi. È da intendersi per cani senza metastasi viscerali.

Voglio sottolineare che ogni caso deve essere valutato in tutti i suoi aspetti, ed è soltanto il veterinario curante ad avere il quadro complessivo.

**SCENARIO 1** – Mastocitoma cutaneo di basso grado (1-2 Patnaik, low Kiupel), asportato con margini radicali. Linfonodo regionale rimosso e di stadio HN0- HN1- HN2 secondo Weishaar (2014).

La prognosi è buona/eccellente, e la chirurgia è da considerarsi curativa. Non sono consigliati marcatori/analisi mutazionale, che possono tuttavia essere richiesti laddove si volesse una conferma definitiva della non aggressività biologica.

**SCENARIO 2** – Mastocitoma cutaneo di basso grado (1-2 Patnaik, low Kiupel), asportato con margini radicali. Linfonodo regionale rimosso e di stadio HN3 secondo Weishaar.

Lo stadio HN3 per il linfonodo regionale indica la metastasi conclamata, ed è un fattore prognostico negativo. In questo caso, la chirurgia non può essere consi-



derata curativa, ed è necessario ricorrere alla terapia medica (chemioterapia o inibitori tirosin-chinasici). In questo caso il test più utile è l'esame mutazionale sui diversi esoni di c-kit: se è presente una mutazione attivante (ad es, ITD), è possibile trattare il cane con farmaci anti-tirosin-chinasici. L'esame mutazionale può essere eseguito sia sul tumore primitivo sia sul linfonodo metastatico (concordanza del 100%).

La valutazione immunohistochimica del pattern di espressione di KIT (CD117) ha valenza prognostica. La patologica localizzazione citoplasmatica di KIT (pattern 3) è significativamente associata alla presenza di mutazioni nel gene c-kit (che vanno comunque confermate mediante analisi genetiche, in quanto sono segnalati falsi positivi e falsi negativi). I mastocitomi che mostrano aberrante localizzazione immunohistochimica di KIT (pattern 2 o 3) hanno prognosi peggiore di quelli con pattern 1.

**SCENARIO 3** – Mastocitoma cutaneo di basso grado (1-2 Patnaik, low Kiupel), asportato con margini radicali. Stato del linfonodo regionale sconosciuto (non asportato).

Questa è una situazione di difficile gestione, perché manca lo step più importante dello staging. L'ideale sarebbe ritornare in chirurgia ed eseguire la linfadenectomia. Se non fosse possibile, i seguenti marcatori possono aiutare nel predire il comportamento biologico: immunohistochimica per Ki67 e KIT pattern, esame mutazionale.

La citologia del linfonodo regionale deve essere inclusa nella valutazione del caso.

**SCENARIO 4** – Mastocitoma cutaneo di basso grado (1-2 Patnaik, low Kiupel), asportato senza margini radicali. Linfonodo regionale rimosso e di stadio HN0-HN1-HN2 secondo Weishaar.

Non tutti i mastocitomi di basso grado, asportati senza radicalità, recidivano. Pertanto la radicalizzazione chirurgica oppure la radioterapia adiuvante non trovano sempre indicazione. A questo proposito ci aiuta il marcatore Ag67 (che deriva dal prodotto AgNor e Ki67): se  $>54$ , il rischio di recidiva locale è elevato, ed in questo caso è prudente ricorrere ad una terapia adiuvante (seconda chirurgia, radioterapia).

pia). Gli altri marcatori immunoistochimici (Ki67 e pattern KIT), se valutati insieme, aiutano a valutare il rischio di recidiva locale. Il test mutazionale invece non è utile, poiché non è indicata la terapia medica.

**SCENARIO 5** – Mastocitoma cutaneo di basso grado (1-2 Patnaik, low Kiupel), asportato senza margini radicali. Linfonodo regionale rimosso e di stadio HN3 secondo Weishaar.

I problemi sono due: mancato controllo locale e presenza di metastasi nodali.

Per il controllo locale, vale quanto riportato nello scenario 4. Essendo il linfonodo metastatico, è indicata la terapia medica, pertanto l'analisi mutazionale è utile per la scelta terapeutica.

**SCENARIO 6** – Mastocitoma cutaneo di basso grado (1-2 Patnaik, low Kiupel), asportato senza margini radicali. Stato del linfonodo regionale sconosciuto (non asportato).

Manca il controllo locale, ma come già detto, il margine non radicale non indica necessariamente la recidiva. In questo scenario è indicato richiedere Ag67, Ki67 e pattern KIT per anticipare un comportamento biologico più aggressivo, e quindi un maggior rischio di recidiva.

La citologia del linfonodo regionale deve essere inclusa nella valutazione del caso. L'ideale sarebbe comunque tornare in chirurgia per asportare il linfonodo regionale e quindi anche radicalizzare la ferita chirurgica.

**SCENARIO 7** – Mastocitoma cutaneo di alto grado (3 Patnaik, high Kiupel), asportato con margini radicali. Stato del linfonodo regionale da HN0 a HN2. Non esistono chiare indicazioni circa l'utilizzo di terapia medica; secondo alcuni studi è prudente consigliarla. In questo caso, è ideale richiedere l'analisi mutazionale.

**SCENARIO 8** – Mastocitoma cutaneo di alto grado (3 Patnaik, high Kiupel), asportato con margini radicali. Stato del linfonodo regionale HN3.

La terapia medica è indicata: richiedere l'analisi mutazionale.

**SCENARIO 9** – Mastocitoma cutaneo di alto grado (3 Patnaik, high Kiupel), asportato senza margini radicali. Stato del linfonodo regionale HN0-HN3.

Il comportamento biologico è aggressivo, soprattutto se il linfonodo è di stadio istologico HN3. La terapia medica è indicata: richiedere pertanto l'analisi mutazionale.

Solitamente i mastocitomi di alto grado asportati senza radicalità tendono a recidivare, e i marcatori in questo caso non aggiungono informazioni utili ai fini della gestione clinica.

**SCENARIO 10** – Mastocitoma cutaneo di alto grado (3 Patnaik, high Kiupel), asportato con margini radicali. Stato del linfonodo regionale sconosciuto (non asportato).

L'asportazione del linfonodo regionale migliora la prognosi ed è suggerita. Si consiglia di richiedere l'analisi mutazionale.

**SCENARIO 11** – Mastocitoma cutaneo di alto grado (3 Patnaik, high Kiupel), asportato senza margini radicali. Stato del linfonodo regionale sconosciuto (non asportato).

L'asportazione del linfonodo regionale migliora la prognosi ed è suggerita. Si consiglia di richiedere l'analisi mutazionale.

Solitamente i mastocitomi di alto grado asportati senza radicalità tendono a recidivare: i marcatori in questo caso non aggiungono informazioni utili ai fini della gestione clinica.

### **Bibliografia selezionata**

Ferrari R, Marconato L, Buracco P, Boracchi P, Giudice C, Iussich S, Grieco V, Chiti LE, Favretto E, Stefanello D. The impact of extirpation of non-palpable/normal-sized regional lymph nodes on staging of canine cutaneous mast cell tumours: A multicentric retrospective study. *Vet Comp Oncol.* 2018Dec;16(4):505-510.

Kiupel M, Webster JD, Bailey KL et al. Proposal of a 2-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors to more accurately predict biological behavior. *Vet Pathol*. 2011 Jan;48(1):147-55.

Marconato L, Polton G, Stefanello D, Morello E, Ferrari R, Henriques J, Tortorella G, Benali SL, Bergottini R, Vasconi ME, Annoni M, Sabattini S. Therapeutic impact of regional-lymphadenectomy in canine stage II cutaneous mast cell tumours. *Vet Comp Oncol*. 2018 Dec;16(4):580-589.

Marconato L, Stefanello D, Kiupel M, Finotello R, Polton G, Massari F, Ferrari R, Agnoli C, Capitani O, Giudice C, Aresu L, Vasconi ME, Rigillo A, Sabattini S. Adjuvant medical therapy provides no therapeutic benefit in the treatment of dogs with low-grade mast cell tumours and early nodal metastasis undergoing surgery. *Vet Comp Oncol*. 2020 Jan 12. doi: 10.1111/vco.12566.

Marconato L, Zorzan E, Giantin M, Di Palma S, Cancedda S, Dacasto M. Concordance of c-kit mutational status in matched primary and metastatic cutaneous canine mast cell tumors at baseline. *J Vet Intern Med*. 2014 Mar- Apr;28(2):547-53.

Moore AS, Frimberger AE, Taylor D, Sullivan N. Retrospective outcome evaluation for dogs with surgically excised, solitary Kiupel high-grade, cutaneous mast cell tumours. *Vet Comp Oncol*. 2020 Jan 9. doi: 10.1111/vco.12565.

Patnaik AK, Ehler WJ, MacEwen EG. Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. *Vet Pathol*. 1984 Sep;21(5):469-74.

Sledge DG, Webster J, Kiupel M. Canine cutaneous mast cell tumors: A combined clinical and pathologic approach to diagnosis, prognosis, and treatment selection. *Vet J*. 2016 Sep;215:43-54.

Smith J, Kiupel M, Farrelly J, Cohen R, Olmsted G, Kirpensteijn J, Brocks B, Post G. Recurrence rates and clinical outcome for dogs with grade II mast cell tumours with a low AgNOR count and Ki67 index treated with surgery alone. *Vet Comp Oncol*. 2017 Mar;15(1):36-45.

Stefanello D, Buracco P, Sabattini S, Finotello R, Giudice C, Grieco V, Iussich S, Tursi M, Scase T, Di Palma S, Bettini G, Ferrari R, Martano M, Gattino F, Marrington M, Mazzola M, Elisabetta Vasconi M, Annoni M, Marconato L. Comparison of 2- and 3-category histologic



grading systems for predicting the presence of metastasis at the time of initial evaluation in dogs with cutaneous mast cell tumors: 386 cases (2009-2014). *J Am Vet Med Assoc.* 2015 Apr;246(7):765-9.

Thamm DH, Avery AC, Berlato D, Bulman-Fleming J, Clifford CA, Hershey AE, Intile JL, Jones PD, Kamstock DA, Liptak JM, Pavuk A, Peuroi J, Powell R, Risetto K, Valli VEO, Webster JD. Prognostic and predictive significance of KIT protein expression and c-kit gene mutation in canine cutaneous mast cell tumours: A consensus of the Oncology- Pathology Working Group. *Vet Comp Oncol.* 2019 Dec;17(4):451-455.

Weishaar KM, Thamm DH, Worley DR, Kamstock DA. Correlation of nodal mast cells with clinical outcome in dogs with mast cell tumour and a proposed classification system for the evaluation of node metastasis. *J Comp Pathol.* 2014 Nov;151(4):329-38.

**Luca Aresu**, Università di Torino e Esperto MYLAV in patologia  
**Walter Bertazzolo**, Direttore Scientifico di Mylav

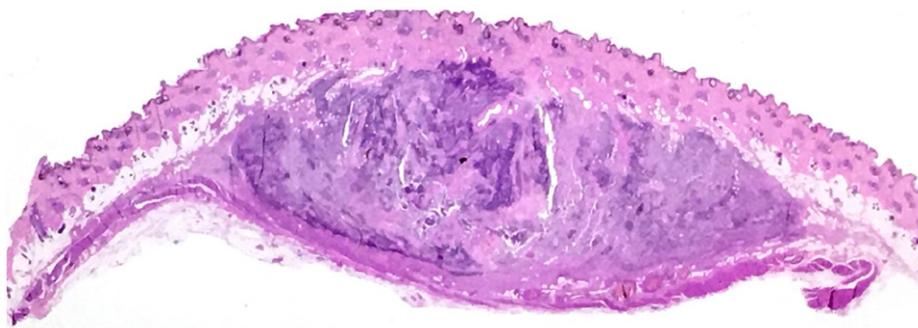


## IL MASTOCITOMA SOTTOCUTANEO DEL CANE: COSA POSSIAMO FARE?

Il mastocitoma sottocutaneo è una neoplasia meno frequente della controparte cutanea e per la quale abbiamo meno dati scientifici a disposizione. Pertanto non possiamo attualmente indicare delle linee guida precise come per quello a localizzazione dermica.

Abbiamo cercato comunque di fornire delle indicazioni pratiche per il clinico, al fine di facilitare l'utilizzo dei test diagnostici aggiuntivi e delle eventuali terapie adiuvanti. Clinicamente i mastocitomi sottocutanei possono essere facilmente confusi con altre neoplasie benigne, come ad esempio i lipomi, e istologicamente si presentano come noduli o masse sottocutanee demarcate senza coinvolgimento del derma.

Al contrario dei mastocitomi dermici, i sottocutanei attualmente non vengono gradati istologicamente/citologicamente.



Sebbene i mastocitomi sottocutanei siano ritenuti a comportamento biologico più benigno, una parte di essi dà metastasi e si comporta in modo aggressivo, soprattutto quelli a crescita infiltrante e con conta mitotica  $>4/HPF$ . Anche questo dato prognostico è tuttavia basato su evidenze scientifiche meno robuste di quanto ad oggi sappiamo sul mastocitoma cutaneo.

## **È possibile prevedere quali mastocitomi sottocutanei hanno un comportamento più aggressivo?**

Questa guida è intesa per aiutare il clinico a orientarsi nella richiesta dei test aggiuntivi, che possano fornire informazioni prognostiche ed un ausilio all'orientamento terapeutico. È da intendersi per cani senza metastasi viscerali. Va rimarcato che le indicazioni che ho elencato nei diversi possibili scenari, sono il risultato di informazioni scientifiche meno robuste rispetto alla controparte cutanea, pertanto è possibile che nel prossimo futuro queste linee guida possano venir modificate, con la disponibilità di nuovi dati in letteratura.

Voglio sottolineare infine che ogni caso deve essere valutato in tutti i suoi aspetti, ed è soltanto il veterinario curante ad avere il quadro complessivo.

### **SCENARIO 1 – Mastocitoma sottocutaneo asportato con margini radicali. Linfonodo regionale rimosso e di stadio HN0-HN1-HN2 secondo Weishaar.**

La prognosi è buona/ eccellente, e la chirurgia è da considerarsi curativa. Non sono consigliati marcatori/ analisi mutazionale, che possono tuttavia essere richiesti laddove si volesse una conferma definitiva della non aggressività biologica. Per i casi con conta mitotica >4/HPF o con pattern di crescita infiltrante, è prudente suggerire follow-up più frequenti.

### **SCENARIO 2 – Mastocitoma sottocutaneo asportato con margini radicali. Linfonodo regionale rimosso e di stadio HN3 secondo Weishaar.**

Lo stadio HN3 per il linfonodo regionale indica la metastasi conclamata, ed è un fattore prognostico negativo. In questo caso, la chirurgia non può essere considerata curativa, ed è necessario ricorrere alla terapia medica (chemioterapia o inibitori tirosinchinasici). In questo caso il test più utile è l'esame mutazionale sui diversi esoni di c-kit: se è presente una mutazione attivante (ad es, ITD), è possibile trattare il cane con farmaci anti-tirosinchinasici. L'esame mutazionale può essere eseguito sia sul tumore primitivo sia sul linfonodo metastatico (concordanza del 100%).

### **SCENARIO 3 – Mastocitoma sottocutaneo asportato con margini radicali. Stato del linfonodo regionale sconosciuto (non asportato).**

Questa è una situazione di difficile gestione, perché manca lo step più importante dello staging. L'ideale sarebbe ritornare in chirurgia ed eseguire la linfadenectomia. Se non fosse possibile, i seguenti marcatori possono aiutare nel predire il comportamento biologico: Ki67, KIT pattern, esame mutazionale. La citologia del linfonodo regionale deve essere inclusa nella valutazione del caso.

### **SCENARIO 4 – Mastocitoma sottocutaneo asportato senza margini radicali. Linfonodo regionale rimosso e di stadio HN0-HN1-HN2 secondo Weishaar.**

Non tutti i mastocitomi sottocutanei asportati senza radicalità recidivano. Pertanto la radicalizzazione chirurgica oppure la radioterapia adiuvante non trovano sempre indicazione. A questo proposito, oltre al pattern di crescita, ci aiutano: conta mitotica (cut-off 4), Ki67, Ag67, KIT pattern. Il test mutazionale invece non è utile, poiché non è indicata la terapia medica.

### **SCENARIO 5 – Mastocitoma sottocutaneo asportato senza margini radicali. Linfonodo regionale rimosso e di stadio HN3 secondo Weishaar.**

I problemi sono due: mancato controllo locale e metastasi nodali. Per il controllo locale, vale quanto riportato nello scenario 4. È indicata inoltre l'analisi mutazionale per la scelta terapeutica, dal momento che lo stadio HN3 per il linfonodo regionale indica la metastasi conclamata, ed è necessaria una terapia medica antitumorale.

### **SCENARIO 6 – Mastocitoma sottocutaneo asportato senza margini radicali. Stato del linfonodo regionale sconosciuto (non asportato).**

Manca il controllo locale, ma come già detto, il margine non radicale non indica necessariamente la recidiva. In questo scenario è indicato richiedere conta mitotica (cut-off 4), Ki67, Ag67, KIT pattern per anticipare un comportamento biologico più aggressivo, e quindi un maggior rischio di recidiva. La citologia del linfonodo regionale deve essere inclusa nella valutazione del caso. L'ideale sarebbe comunque tornare in chirurgia per asportare il linfonodo regionale e quindi anche radicalizzare la ferita chirurgica.

## **Bibliografia selezionata**

Newman SJ, Mrkonjich L, Walker KK, Rohrbach BW. Canine Subcutaneous Mast Cell Tumour: Diagnosis and Prognosis. *J. Comp. Pathol.* 2007; 136, 231–239.

Thompson JJ, Pearl DL, Yager JA, et al. Canine subcutaneous mast cell tumor: Characterization and prognostic indices. *Vet. Pathol.* 2011; 48, 156–168.

Thompson JJ, Yager JA, Best SJ, et al. Canine subcutaneous mast cell tumors: Cellular proliferation and kit expression as prognostic indices. *Vet. Pathol.* 2011; 48, 169–181.

Thompson JJ, Morrison JA, Pearl DL, et al. Receptor Tyrosine Kinase Expression Profiles in Canine Cutaneous and Subcutaneous Mast Cell Tumors. *Vet. Pathol.* 2015; 53, 545–558.

Weishaar KM, Thamm DH, Worley DR, Kamstock DA. Correlation of nodal mast cells with clinical outcome in dogs with mast cell tumour and a proposed classification system for the evaluation of node metastasis. *J. Comp. Pathol.* 151, 329–338 (2014).

**Laura Marconato**, Università di Bologna, Esperto MYLAV in oncologia

**Luca Aresu**, Università di Torino, Esperto MYLAV in patologia

**Walter Bertazzolo**, Direttore Scientifico di Mylav

## LE MALATTIE TRASMESSE DA VETTORI IN ITALIA: DIFFUSIONE E PREVALENZA

Qual è l'attuale diffusione e prevalenza delle più comuni malattie trasmesse da vettori nei nostri animali da compagnia in Italia? Non è semplice dare una risposta ma abbiamo cercato di fornire un aggiornamento basandoci su dati attualmente pubblicati e disponibili in letteratura. Ce ne parla Luigi Venco, nostro consulente in Parassitologia.

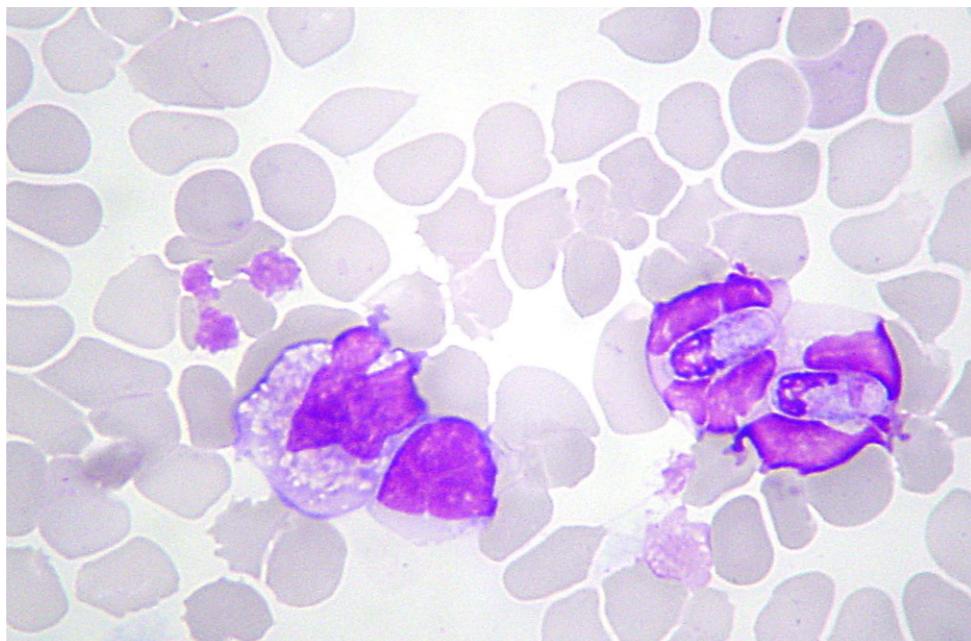


Figura 1 – *Hepatozoon canis*.

È difficile valutare l'effettiva prevalenza dell'infezione dei diversi agenti patogeni trasmessi da vettori (CVBD – Canine Vector Borne Diseases) in cani e gatti in Italia, a causa della quantità limitata di dati e della difficoltà nel confrontare le in-

formazioni dagli studi basati su diversi strumenti diagnostici. Le prevalenze delle infezioni da agenti patogeni trasmessi da vettori variano inoltre in base alla regione geografica e alle diverse condizioni climatiche e del territorio.

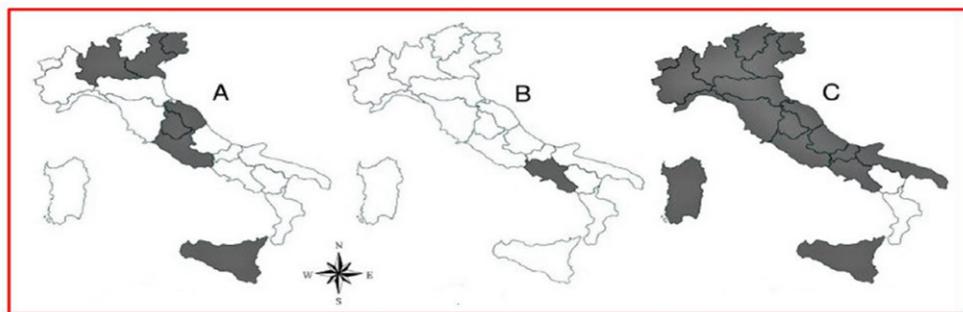
Gli agenti eziologici che rivestono maggiore importanza per diffusione e implicazione cliniche sono, nel nostro paese: *Babesia* spp., *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens*, *Leishmania infantum* ed *Hepatozoon canis*.

## Babesiosi

Esistono dati limitati sulla prevalenza delle infezioni da *Babesia* sp. Nell'Italia centrale e settentrionale si osserva una sieroprevalenza media del 34% sulla base della ricerca di anticorpi anti-*Babesia* con una tendenza decrescente dalle aree centrali a quelle settentrionali, con una maggiore predisposizione per cani di canile o età tra i 25 e 48 mesi.

Indagini molecolari sulle diverse specie di *Babesia* spp. in campioni di sangue di cani con segni clinici compatibili, dimostrano che *B. canis* viene rilevato principalmente nel nord Italia, mentre *B. vogeli* è presente principalmente nella zona centrale e nell'Italia meridionale.

*Babesia gibsoni* in Italia invece è riscontrabile con maggior frequenza nelle aree centro meridionali, in particolare in Campania.



**A** *Babesia canis*. **B** *Babesia gibsoni*. **C** *Babesia vogeli*.

## Ehrlichia canis ed Anaplasma sp.

Per quanto concerne *Ehrlichia canis*, la prevalenza stimata sulla base dei dati sierologici, varia dal 14,9% nel sud Italia al 46,7% in Sardegna, mentre la prevalenza complessiva valutata tramite Real time PCR è ovviamente inferiore a quella indicata dalla sierologia, indicando che l'infezione è più diffusa nel sud (9,7%) che nel centro (8%) e nel nord (2,9%) Italia. Queste discrepanze sono dovute ai diversi metodi utilizzati in ogni studio, ma anche al fatto che il rischio di infezione da *E. canis* varia in base a fattori strettamente locali (ad es. popolazione vettoriale, densità e modelli di attività). *Anaplasma platys* è stato rilevato molecolarmente in Italia centrale (23%) e meridionale (11,3%), spesso in associazione ad *E. canis*. mentre *A. phagocytophilum* in Italia meridionale (3.7%).



**A** *Anaplasma phagocytophilum*. **B** *Anaplasma platys*. **C** *Ehrlichia canis*.

## Filariosi

Negli ultimi 20 anni. *Dirofilaria immitis* ha mostrato un rilevante aumento della prevalenza all'interno delle aree storicamente endemiche (22-80% nei soggetti non sottoposti a chemiopprofilassi) e una diffusione al di fuori della principale area endemica della Pianura Padana, come nelle province dell'Italia nord-orientale precedentemente considerate non endemiche. Inoltre, *D. immitis* è diventata endemica nelle regioni centrali come la Toscana e l'Umbria.



Un recente studio condotto su cani del sud Italia ha verificato prevalenze di *D. repens* (1,4%) e *D. immitis* (0,5%) in Campania. Coinfezioni da *D. immitis* e *D. repens* sono state registrate anche in Puglia e Calabria, con tassi di prevalenza fino all'1,6%. La diffusione di *D. repens* nel nord Italia e nuovi focolai di *D. immitis* recentemente rilevati nelle regioni meridionali come la Sicilia, indicano che i cani sono a rischio sia per *Dirofilaria immitis* sia per *D. repens* in tutto il paese, se non sottoposti a misure profilattiche.

## **Leishmaniosi**

Per lungo tempo la Leishmaniosi canina (da *Leishmania infantum*) è stata considerata stabilmente endemica nell'Italia meridionale e centrale, e nelle aree litoranee del nord Italia, con tassi di siero prevalenza fino al 53,1%.

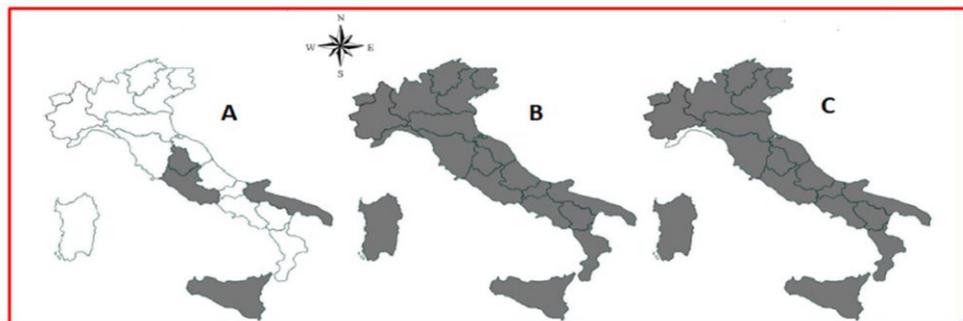
Sulla base di dati recenti inerenti la raccolta e l'identificazione di flebotomi, l'individuazione di casi autoctoni nel cane e di casi nell'uomo, nuovi focolai di Leishmaniosi canina sono stati individuati nelle regioni settentrionali in cui la malattia era precedentemente considerata non endemica. Inizialmente nelle regioni collinari appenniniche ma attualmente anche nella Pianura Padana, dove in seguito al cambiamento delle condizioni climatiche (aumento delle temperature invernali, scomparsa della nebbia), si verificano le condizioni per la sopravvivenza dei Flebotomi in diapausa nel periodo invernale. Sono di recentissima segnalazione nuovi focolai nel Piemonte e nel Triveneto, ma anche in Lombardia, con tendenza alla diffusione dalle zone oltre-padane a quelle cis-padane nella provincia di Pavia e numerosi altri focolai nelle provincie di Bergamo, Brescia, Lodi, Milano e Cremona.

Anche per *L. infantum* i cani devono quindi essere considerati a rischio in tutto il paese.

## **Hepatozoonosi**

Per quanto esistano segnalazioni di casi sporadici di *Hepatozoon canis* nell'Italia settentrionale, questo patogeno è riscontrabile con elevate prevalenze nel centro

e sud Italia, spesso in associazione a CVBD trasmesse da *Rhipicephalus sanguineus* (ospite definitivo) che infetta il cane (ospite intermedio) non con il morso, ma tramite l'ingestione della zecca intera.

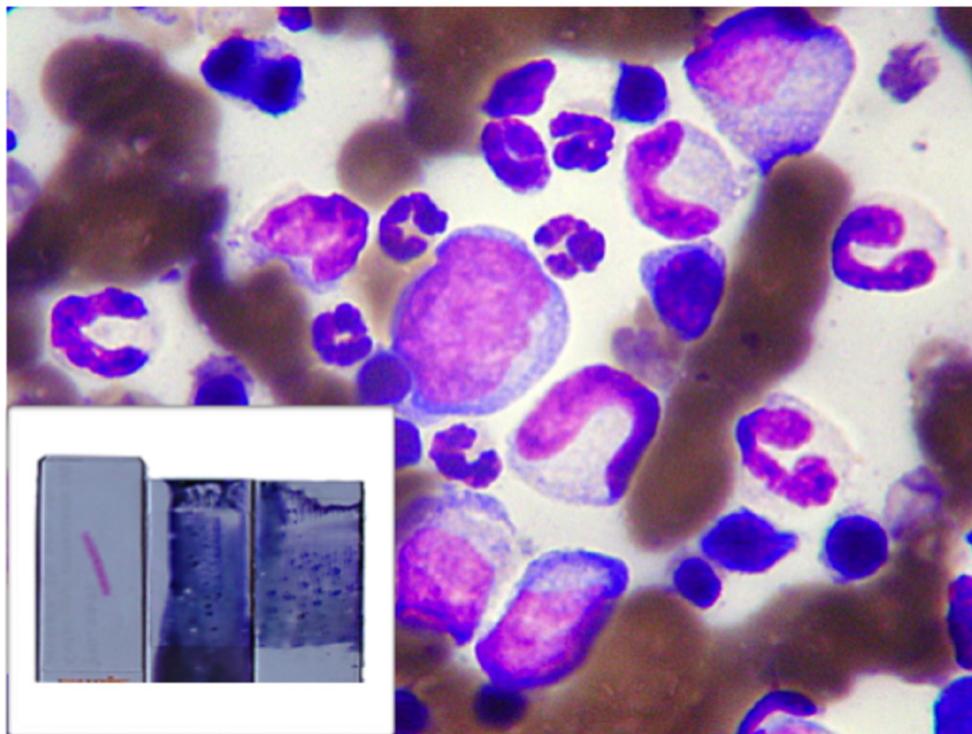


**A** Hepatozoon canis. **B** Leishmania infantum. **C** Dirofilaria immitis

Immagini tratte da Otranto D., Dantas Torres F “Prevalence of infection by vector-borne pathogens in cats and dogs in Italy” Parasites & Vectors 2010.

**Di Luigi Venco**, EBVS European Specialist  
in Veterinary Parasitology (Dipl. EPVC), Esperto MYLAV.

## **ERRORI DA EVITARE: COME NON STRISCIARE UN CAMPIONE DI MIDOLLO OSSEO**



Avete fatto un campionamento di midollo osseo perfetto per un esame citologico, ma invece che strisciarlo appropriatamente, lo avete preparato lasciandolo gocciolare sul vetrino per gravità (come nella foto seguente). Il risultato? avrete un campione non diagnostico.

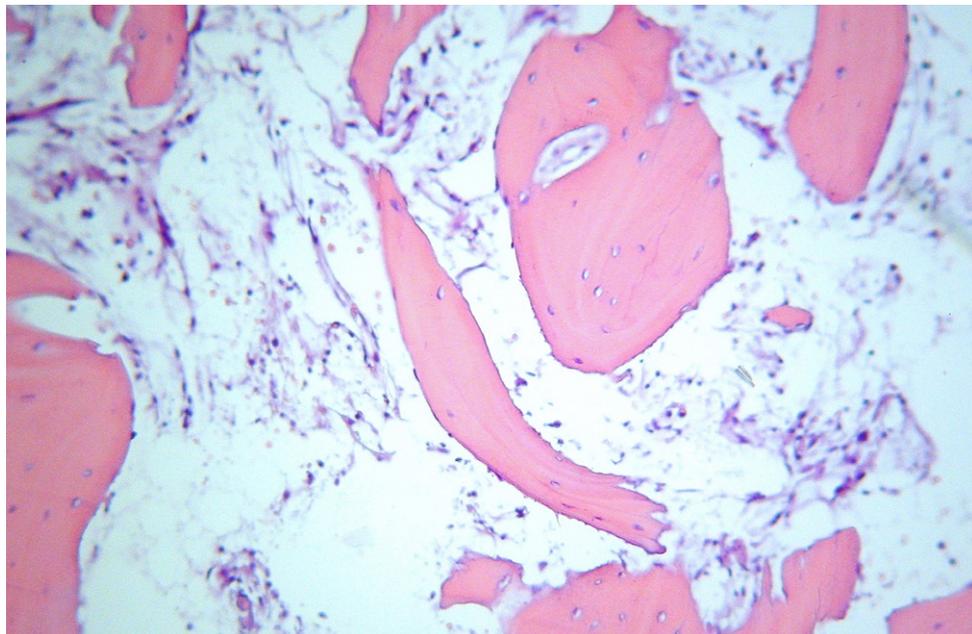
Vi diamo alcuni consigli su come si deve fare la procedura corretta che porta a risultati valutabili come mostrato nella immagine seguente.



*Figura 1 – Strisci di buona qualità e campione citologico ben interpretabile.*

Per una corretta interpretazione citologica, l'esame del midollo osseo richiede una adeguata qualità: gli aspetti microscopici sono interpretabili correttamente solo se il campione è rappresentativo ed è adeguatamente preparato (come nei due strisci a destra dell'immagine precedente). A tale fine i seguenti due punti cardine devono essere rigorosamente soddisfatti:

- 1) il campionamento deve essere eseguito a regola d'arte (vedi questo nostro Blog: <https://www.mylavblog.net/blog/view/140>)
- 2) lo striscio deve essere eseguito altrettanto accuratamente (vedi questo nostro Blog: <https://www.mylav.net/blog/view/150>)



*Figura 2 – Strisci di cattiva qualità ottenuti per gocciolamento.*

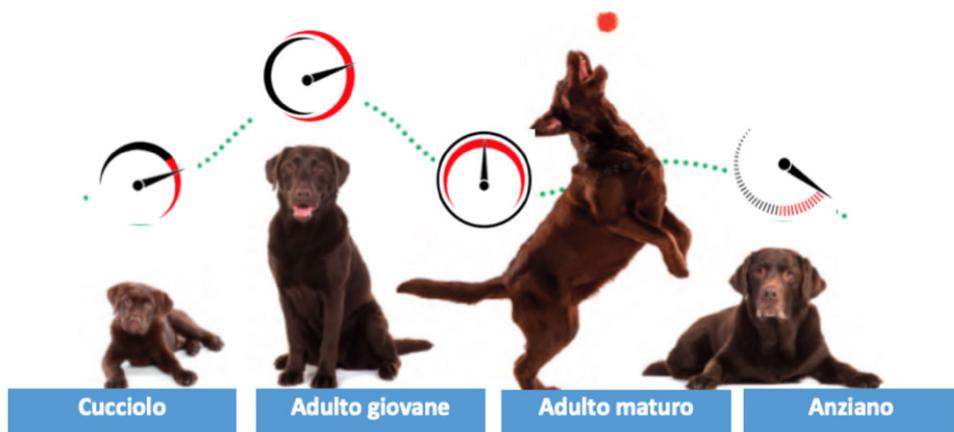
Riceviamo purtroppo ancora dei campioni non strisciati, ma preparati solo per gocciolamento, come nella foto precedente. Un campione così fissato risulterà ingiudicabile all'esame microscopico, in quanto troppo spesso e con sovrapposizione delle varie cellule, che non permetterà di ottenere una valutazione quali/quantitativa adeguata.

Ovviamente ci sono situazioni in cui anche un campionamento ed una preparazione perfetta, condurranno ad un campione non diagnostico, ma queste sono tendenzialmente legate a gravi patologie midollari in cui il tessuto ematopoietico è stato ampiamente rimpiazzato da tessuto adiposo (es. aplasia midollare) o fibroso (es. mielofibrosi), come nell'immagine successiva. In questi casi purtroppo l'unica procedura in grado di fornirvi una diagnosi definitiva è la biopsia istologica midollare.

**Walter Bertazzolo**, EBVS European Specialist  
in Veterinary Clinical Pathology (Dipl. ECVCP); Direttore Scientifico di MYLAV.

## COME VALUTARE LA SALUTE DEL CANE IN BASE ALLA SUE ETÀ: LE LIFE STAGE GUIDELINES

Nell'ultimo decennio l'American Animal Hospital Association e la American Association of Feline Practitioners hanno deciso di creare delle linee guida per i medici veterinari, che li aiutassero ad individuare le procedure sanitarie più importanti da proporre ai proprietari di cani e gatti, al fine di salvaguardarne la salute di entrambi, focalizzando in particolare l'attenzione sull'età del paziente. Per ogni fascia di età sono stati individuati una serie di punti critici su cui focalizzare gli interventi di prevenzione e cura dell'animale. Vediamo in nei dettagli cosa è stato proposto per il cane. Nella prossima puntata vi daremo anche le indicazioni relative al gatto.



Nel 2012 l'American Animal Hospital Association (AAHA), in considerazione della crescente importanza che il cane ha assunto nella società e negli affetti dell'uomo, ha pubblicato le prime linee guida per la salvaguardia della salute del cane (Bartges et al., 2012). Linee guida che fanno seguito a quelle pubblicate nel 2010 dalla stessa AAHA in collaborazione con l'American Association of Feline Practitioners (AAFP) per il gatto (Vogt et al., 2010), e che sono state rivedute, aggiornate e riproposte sette anni dopo nella loro seconda edizione (Creevy et al., 2019). Una delle peculiarità di queste linee guida è quella di aver suddiviso la vita del cane in stadi,

non rigidamente definiti in termini esclusivi di età, ma che tenessero conto sia di questo parametro che di altre caratteristiche (Tabella 1).

Tabella 1. Suddivisione della vita del cane in stadi.	
<b>Cucciolo</b>	Dalla nascita alla cessazione della crescita rapida (6 mesi - 9 mesi, variabile con la razza e la taglia).
<b>Adulto giovane</b>	Dalla cessazione della rapida crescita fino al completamento della maturazione fisica e sociale, che si verifica nella maggior parte dei cani dai 3 ai 4 anni.
<b>Adulto maturo</b>	Dal completamento della maturazione fisica e sociale fino all'ultimo quarto della durata stimata della vita (razza e taglia dipendente).
<b>Anziano</b>	L'ultimo quarto della durata stimata della vita fino alla fine della vita stessa.
<b>Ultima fase di vita</b>	Stadio terminale (dipendente dalle specifiche patologie).

Sebbene la suddivisione in stadi sia arbitraria, permette di identificare interventi individualizzati, specifici e adatti alle diverse esigenze che può avere il cane nei diversi momenti della sua vita. Al fine sono state anche identificate dieci aree focalizzate di assistenza sanitaria (Tabella 2), per ciascuna delle quali sono state date indicazioni adeguate ai diversi stadi di vita del cane, utili a mettere in atto tutta una serie di attività di prevenzione.

Tabella 2. Aree di assistenza sanitaria (AAS)
1. Stile di vita degli animali domestici e valutazione della sicurezza
2. Zoonosi e sicurezza dell'uomo
3. Comportamento
4. Valutazione nutrizionale
5. Controllo dei parassiti
6. Vaccinazione
7. Cure odontoiatriche
8. Salute riproduttiva
9. Considerazioni specifiche di razza
10. Dati di base

Alcune di queste aree di assistenza sanitaria, come la **prevenzione dei parassiti interni** e la **profilassi vaccinale**, prevedono che le differenze di approccio tra i diversi stadi di vita siano per lo più quantitative. Essenzialmente, sono previsti un maggior numero di interventi nei cuccioli. In altre circostanze invece, lo stadio di vita comporta responsabilità ed interventi molto diversi, così come è il caso della **gestione comportamentale** o della **prevenzione dei rischi che si possono trovare nell'ambiente**, casi questi che pongono in essere considerazioni ed attività differenziate, a seconda che si abbia a che fare con un cucciolo, un cane adulto o un cane anziano.

Una importante area di prevenzione considerata, è quella relativa alle **zoonosi e alla sicurezza dell'uomo**. La task de force sul tema suggerisce una serie di comportamenti da adottare in clinica dai veterinari, e precauzioni da suggerire ai proprietari. Per le prime, si evidenzia l'importanza di informare sempre tutto il team della clinica, dell'arrivo di eventuali animali infetti e di limitarne le aree di accesso e gli spostamenti in struttura. Ai proprietari vanno date indicazioni utili a limitare le occasioni di contatto dei propri animali con i selvatici, a rimuovere prontamente le feci, soprattutto dei cuccioli che possono diffondere grandi quantità di uova di ascaridi zoonotici, e ad evitare l'alimentazione del cane con cibo crudo. Soprattutto, quest'ultima pratica è da sconsigliare per i cani impegnati nei programmi di pet therapy o nelle famiglie con soggetti immunocompromessi (ad esempio anziani, bambini con meno di 5 anni di età, donne in gravidanza o soggetti sottoposti a terapia immunosoppressiva).

Altrettanto importante l'attenzione dedicata agli **aspetti comportamentali**, che possono essere alla base di disagi con conseguenze esitabili finanche nell'abbandono. È importante che lo stato mentale del cane venga riportato nella sua cartella clinica, così come che l'approccio al cane sia individualistico e non stereotipato. Altri aspetti, come l'importanza della socializzazione del cucciolo in età vaccinale, gli accorgimenti della fase di crescita più critica (tra i 6 mesi e i 3 anni di età) o di quelli relativi ai sintomi da disfunzioni cognitive dell'anziano, vengono trattati diffusamente in queste linee guida alle quali si rimanda per approfondimenti.

Un'area di assistenza oggi molto rivalutata dal veterinario, è quella relativa alla valutazione degli **aspetti nutrizionali**. Gli Autori ricordano l'utilità di attribuire ai cani punteggi relativi alle condizioni corporea ( body condition score, BCS) e muscolare (muscle condition score, MCS), punteggi che andrebbero inclusi nella cartella clinica del paziente. Inoltre, se nella fase di crescita è particolarmente importante considerare le peculiari necessità nutrizionali di questa condizione fisiologica, per l'adulto sarà più importante controllare il peso, ad evitare i diffusi problemi di obesità che incidono negativamente sulla longevità del cane. Per finire, nei cani anziani si suggerisce di tenere sotto controllo il MCS che tende a diminuire, anche in misura della riduzione di movimento.

La **salute riproduttiva** del cane rappresenta un'altra area di studio in continuo addivenire, anche se a volte non è possibile dare chiari suggerimenti, per via di una

letteratura ancora carente di studi. Gli autori di queste linee guida, suggeriscono la castrazione/sterilizzazione di tutti i cani non destinati a riproduzione. L'intervento andrebbe eseguito entro i primi 6 mesi di età per i cani che da adulti peseranno meno di 20,5kg (prima del primo estro nelle cagne). Per i cani maschi che da adulti supereranno i 20,5kg, si suggerisce di intervenire tra i 9-15 mesi di età, per ridurre i rischi di problemi ortopedici o di alcuni tumori. Per le femmine le indicazioni sono ancora poco chiare. Per i cani destinati a riproduzione, si affronteranno con l'allevatore tutta una serie di tematiche che vanno dall'appropriata frequenza di riproduzione, alla consulenza genetica, nonché all'analisi dell'appropriata età di riproduzione e ai periodici controlli di salute dell'apparato riproduttivo.

In conclusione di questa sintesi, si vogliono considerare altre due aree in continua evoluzione in questi ultimi anni, e relative alle **differenze di razza** e al **data base minimo** per la valutazione individuale del trend di salute. Esistono oggi diverse centinaia di razze canine e molte altre combinazioni di razze miste, ognuna con genetica e stili di vita diversi. Almeno due terzi di queste razze canine hanno uno o più disturbi genetici, per questa ragione si impone un'attenzione particolare alle predisposizioni di razza, così come a cogliere le similitudini dei cani di razza mista con quelle di origine, per valutare l'eventualità di una predisposizione a sviluppare gli stessi disturbi. Merita attenzione anche la potenziale differenza dei range di normalità di molti test da una razza all'altra, un punto questo che ben si ricollega al successivo, il **data base minimo individuale**.

Una raccolta di dati minimi nelle varie fasi di vita del cane (Tabella 3), si è dimostrata utile a svelare malattie occulte, ed è di particolare utilità per "fotografare" il set point dei parametri del cane sano, per poi valutare nel tempo il trend di salute dell'animale. A proposito di quest'ultimo, gli autori ricordano come alcune malattie vengano diagnosticate prima che i dati analitici diagnostici (per esempio di un'analisi di laboratorio) superino il range normale dell'intervallo di riferimento di popolazione, grazie all'aumento osservato rispetto ai livelli precedenti dell'individuo. Per chiarire questo punto, facciamo un esempio pratico: abbiamo un cane che per anni ha avuto una creatinina di 0,8 (con un intervallo di riferimento 0,7-1,3) e ad un successivo controllo la sua nuova concentrazione sierica di questo analita diventa 1,2. Ebbene questo non è un dato da trascurare, perché anche se entro i limiti di riferimento per la specie, mostra tuttavia un trend in aumento, che deve

pertanto essere messo sotto accurata osservazione, in quanto potrebbe indicare una riduzione reale della funzione renale.

<b>Tabella 3. Database minimo per stadio di vita dell'animale sano</b>				
	<b>Cucciolo</b>	<b>Adulto giovane</b>	<b>Adulto maturo</b>	<b>Anziano</b>
<b>Test fecale per parassiti</b>	4 nel primo anno	Da 1 a 4 l'anno, sulla base dello stile di vita e dei trattamenti antiparassitari		
<b>Malattie da vettori</b>	N/A	Annualmente		
<b>Filaria</b>	N/A	Annualmente; il test iniziale è importante per valutare lo stato precedente	Annualmente	
<b>Emogramma (HCT, RBC, WBC, leucogramma differenziale, stima piastrinica)</b>	N/A	Considerare come linea di base iniziale	Annualmente	Ogni 6-12 mesi
<b>Biochimica: proteine tot., albumina, ALT, glucosio, BUN, Creatinina, [SDMA se disponibile]</b>	N/A	Considerare il pannello minimo per iniziare	Minimo annuale (considerare un pannello completo)	Completo ogni 6-12 mesi
<b>Analisi urine (peso specifico, sedimento, glucosio, chetoni, bilirubina, proteine, sangue occulto)</b>	N/A	Iniziare	Annuale	Ogni 6-12 mesi
<b>Diagnostica per immagini</b>	N/A	Si consideri lo screening radiografico ortopedico per cani di grande taglia		N/A
<b>Ecocardiografia</b>	N/A	N/A		N/A

N/A: non applicabile, in quanto non c'è abbastanza letteratura per dare raccomandazioni, ma per alcune razze lo screening può essere indicato

In chiusura, si ricorda che l'obiettivo finale della prevenzione è migliorare la qualità della vita e la longevità del paziente. Diversi studi hanno rilevato che le ragioni di questo mancato obiettivo, sono spesso da ricercarsi in una inadeguata comunicazione del team clinico con i proprietari. Il suggerimento è di instaurare con questi ultimi una comunicazione a due vie, avendo cura di non trascurare il ruolo centrale del proprietario nelle decisioni che riguardano i nostri pazienti. Il veterinario deve riuscire a trasmettere l'importanza della prevenzione sia nei termini dei costi, prevenire costa meno che curare, che dei risultati clinici, la diagnosi precoce aumenta le possibilità di successo della terapia.



### **Bibliografia:**

Bartges et al., 2012. AAHA Canine Life Stage Guidelines. J Am Anim Hosp Assoc 48(1):1-11. doi: 10.5326/JAAHA-MS-4009

Creevy et al., 2019. 2019 AAHA Canine Life Stage Guidelines. J Am Anim Hosp Assoc 55(6):267-290. doi: 10.5326/JAAHA-MS-6999

Vogt et al., 2010. AAFP-AAHA: Feline Life Stage Guidelines. J Feline Med Surg 12(1):43-54. doi: 10.1016/j.jfms.2009.12.006.

**Domenico Russo**, DVM, PhD, Key Account Manager MYLAV La Vallonea  
**Walter Bertazzolo**, EBVS European Specialist in Veterinary Clinical Pathology  
(Dipl. ECVCP); Direttore Scientifico di MYLAV.



## COME VALUTARE LA SALUTE DEL GATTO IN BASE ALLA SUE ETÀ: LE LIFE STAGE GUIDELINES

Nell'ultimo decennio l'American Animal Hospital Association e la American Association of Feline Practitioners hanno deciso di creare delle linee guida per i medici veterinari, che li aiutassero ad individuare le procedure sanitarie più importanti da proporre ai proprietari di cani e gatti, al fine di salvaguardarne la salute di entrambi, focalizzando in particolare l'attenzione sull'età del paziente. Per ogni fascia di età sono stati individuati una serie di punti critici su cui focalizzare gli interventi di prevenzione e cura dell'animale. Dopo aver trattato nel blog precedente le linee guida del cane, vediamo nei dettagli cosa è stato proposto per gatto.



Queste linee guida, le prime nel loro genere, sono state redatte dall'American Animal Hospital Association e dall'American Association of Feline Practitioners con l'obiettivo di aiutare il veterinario a garantire un'assistenza sanitaria ottimale ai gatti. A tal fine e per tenere conto delle diverse esigenze del gatto, sono state identificate 6 fasi di vita (tabella 1) e alcune principali aree di assistenza sanitaria (tabella 2). In questo modo, per ciascuna area specialistica si sono dettate le indicazioni e i suggerimenti adeguati ai vari stadi di vita.

Stadi di vita	Età del gatto	Equivalenza con l'età dell'uomo
<b>Gattino</b>	0-1 mese	0-1 anni
	2-3 mesi	2-4 anni
	4 mesi	6-8 anni
	6 mesi	10 anni
<b>Giovane</b>	7 mesi	12 anni
	12 mesi	15 anni
	18 mesi	21 anni
	2 anni	24 anni
<b>Adulto giovane (prime)</b>	3 anni	28 anni
	4 anni	32 anni
	5 anni	36 anni
	6 anni	40 anni
<b>Adulto mature</b>	7 anni	44 anni
	8 anni	48 anni
	9 anni	52 anni
	10 anni	56 anni
<b>Anziano</b>	11 anni	60 anni
	12 anni	64 anni
	13 anni	68 anni
	14 anni	72 anni
<b>Geriatrico</b>	15 anni	76 anni
	16 anni	80 anni
	20 anni	84 anni

#### Aree di assistenza sanitaria.

- 1 Esame del benessere
- 2 Gestione del peso e nutrizionale
- 3 Comportamento e ambiente
- 4 Parassiti
- 5 Vaccinazioni
- 6 Cure dentali



Il punto di partenza è stato fissato nell'**esame dello stato di salute del gatto**. Non è stato nelle intenzioni degli Autori ribadire le basi della visita veterinaria, ma piuttosto di offrire una guida per assistere il veterinario. Il primo nodo da sciogliere è stato quello relativo alla necessità di trasmettere al proprietario l'importanza delle visite periodiche.

Il gatto è diventato negli USA il pet più popolare nelle case degli americani, tuttavia questo dato non fa il paio con le visite dal veterinario, dove il gatto viene portato molto meno di frequente rispetto al cane. Si ritiene che le principali ragioni di questo atteggiamento, siano identificabili nella difficoltà del proprietario a cogliere i segni di malattia del gatto e nella percezione di autosufficienza di questa specie, che contribuisce a rendere il proprietario meno incline a considerarne le esigenze. Inoltre, quando intervistati sull'argomento, i proprietari hanno risposto di non sapere che fosse necessario, che il veterinario non lo aveva raccomandato, o che non gli erano stati ben spiegati la necessità e il beneficio. Altri proprietari hanno attribuito la causa delle mancate visite dal veterinario, allo stress del gatto.

Queste considerazioni fanno capire l'importanza di spiegare al proprietario che una diagnosi precoce di malattia o di disagi comportamentali, può migliorare la gestione del problema e la qualità di vita dell'animale. Altrettanto importante, è far comprendere al proprietario che la vita del gatto ha un ritmo più veloce di quella dell'uomo (tabella 1), che proprio per questa ragione le condizioni di salute possono cambiare in tempi brevi, ciò che spiega la necessità di visite almeno annuali e secondo molti esperti, meglio sarebbe se fossero semestrali. Il momento ottimale per affrontare questi temi può essere quello della prima visita, quando il veterinario non dovrebbe perdere l'occasione di far comprendere anche i vantaggi economici della prevenzione: prevenire costa meno che curare.

La task de force ha poi prodotto numerosi altri consigli, tra i quali l'utilità della raccolta periodica di un minimo di esami (tabella 3) che costituiranno la banca dati del soggetto. Questi dati sono utili per la diagnosi precoce di malattia e per seguire la tendenza di parametri clinici e di laboratorio, il tutto finalizzato ad agevolare una diagnosi precoce, prima che i valori analitici dell'individuo superino quelli di riferimento della popolazione. Un argomento quest'ultimo, che è stato ripreso da letteratura successiva alla pubblicazione di queste linee guida.

	Gattino/giovane	Adulto	Maturo	Anziano/geriatrico
Emogramma Ematocrito, RBC, WBC, conta differenziale, citologia, piastrine	±	±	+	+
Biochimica Almeno: TP, albumina, globuline, ALP, ALT, glucosio, BUN, creatinina, K <sup>+</sup> , P, Na <sup>+</sup> , Ca <sup>2+</sup>	±	±	+	+
Urine Peso specifico, sedimento, glucosio, chetoni, bilirubina, proteine	±	±	+	+
T4		±	±	+
Pressione sanguigna		±	±	+
Test retrovirus	+	±	±	±
Esame feci	+	+	+	+

La seconda area specialistica considerata è quella della **nutrizione**. Per dare le corrette indicazioni sull'argomento è indispensabile considerare lo stile e lo stadio di vita del gatto. I cuccioli, gli adulti con stile di vita indoor oppure quelli con stile di vita outdoor o i riproduttori, hanno esigenze nutrizionali diverse e per valutare l'adeguatezza della dieta somministrata, si consigliano controlli periodici del peso e del punteggio delle condizioni corporee. Nelle linee guida si affrontano anche argomenti molto dibattuti sull'alimentazione del gatto, come ad esempio la scelta tra le crocchette e l'umido, oppure se nella scelta del cibo ci sia razionalità nella letteratura a favore dei cibi a basso contenuto di carboidrati o di quelli grain free. Le conclusioni della task de force sono state che al momento della pubblicazione, non sussistevano le evidenze scientifiche per consigliare un cibo piuttosto che un altro.

Molto importante è la cura degli **aspetti comportamentali e dell'ambiente nel quale i gatti vivono**. I gatti hanno bisogno di giusti stimoli e di un ambiente ricco. I gattini andrebbero abituati da subito agli stimoli ambientali e ad essere manipolati, ricorrendo anche al rinforzo positivo. Fino alle 12 settimane di età prediligono le relazioni sociali con altri gatti, dopo le 12 settimane iniziano ad interessarsi di più agli oggetti, ed in questa fase i giocattoli offrono l'opportunità di esercitare le normali sequenze predatorie. Bisogna spiegare ai proprietari l'importanza della pulizia della lettiera, e suggerire di fornire ai gattini una scelta tra più tipi di lettiera così che possano manifestare la loro preferenza. Quanto agli adulti e agli anziani, si tratta

di soggetti che tendono a ridurre le interazioni sociali e il gioco, la ridotta attività motoria, unitamente alla castrazione/sterilizzazione, può comportare un aumento di peso che si suggerisce di contrastare stimolando sessioni quotidiane di gioco.

In queste linee guida vengono anche fornite indicazioni di carattere generale sulla **prevenzione dei parassiti e delle malattie infettive (vaccinazioni)**. Riguardo ai parassiti si ricorda di valutare lo stile di vita (indoor o outdoor, eventuali viaggi, prevalenza geografica delle parassitosi) e che un maggior numero di interventi contro i parassiti interni sono importanti nei gattini. Quindi si suggeriscono controlli fecali periodici (1-4 volte l'anno nei giovani, 1-2 volte l'anno dagli adulti in poi). Quanto alle vaccinazioni si ribadisce l'importanza di vaccinare tutti i gattini con i vaccini core e di valutare per i non core di volta in volta. In ogni caso sia per i parassiti che per le vaccinazioni si rimanda alle rispettive linee guida per maggiori dettagli.

Per finire, l'ultima area specialistica considerata è quella delle **cure dentali**. Le malattie odontoiatriche sono molto diffuse e spesso i proprietari non ne hanno consapevolezza. Bisognerebbe spiegare ai proprietari che le cure odontoiatriche sono essenziali, per evitare patologie dolorose e che possono coinvolgere lo stato di benessere generale del gatto. Sarebbe una buona pratica, ad esempio, abituare il gatto allo spazzolino dentale e spiegare che la cura dei denti riguarda il gatto in tutti gli stadi di vita.

Gli Autori concludono ribadendo che è stato fatto il tentativo di fare sempre riferimento alle evidenze scientifiche, tuttavia esistono numerose lacune che dovranno essere colmate nei prossimi anni con ulteriori studi. Per cui quando è mancato il supporto di evidenze scientifiche pubblicate, si sono fornite indicazioni sulla base delle esperienze cliniche.

#### **Bibliografia:**

Vogt AH, Rodan I, Brown M, Brown S, Buffington CA Tony, Forman MJ Larue, Neilson J, Sparkes A. 2010. AAFP-AAHA: Feline Life Stage Guidelines. J Feline Med Surg 12(1):43-54. doi:10.1016/j.jfms.2009.12.006

**Domenico Russo**, DVM, PhD, Key Account Manager MYLAV La Vallonea  
**Walter Bertazzolo**, EBVS European Specialist in Veterinary Clinical Pathology  
(Dipl. ECVCP); Direttore Scientifico di MYLAV.

## **ERRORI DA EVITARE: FARE ESAMI DI APPROFONDIMENTO PRIMA DI QUELLI DI BASE**

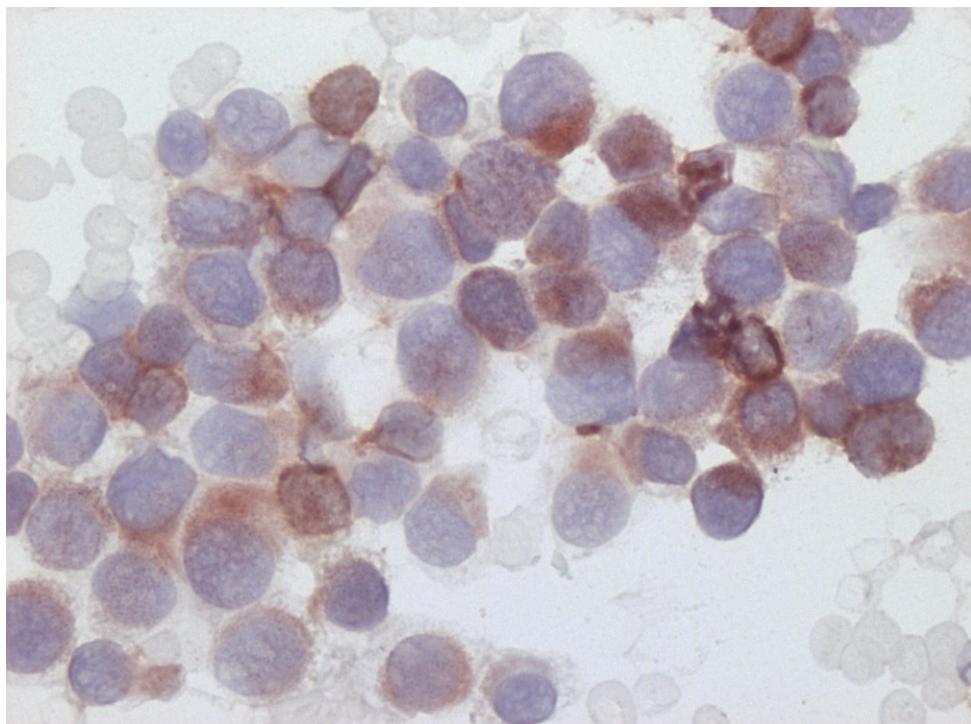
Sembra un'osservazione logica e per molti può apparire come un argomento ovvio ed inutile. Ma vi assicuro che non lo è. Perché ci capita spesso di ricevere richieste di esami di approfondimento avanzati, su casi privi di una diagnostica di laboratorio di base. Vi faccio alcuni esempi e vi spiego perché la cosa può risultare alquanto rischiosa.

**1) Richiedere colorazioni speciali di citochimica ed istochimica o di immunocitochimica ed immunoistochimica, senza passare per la citologia e l'istologia di base:** questa situazione ci capita abbastanza comunemente ed è una procedura completamente sbagliata.

Il patologo deve sempre aver ben presente cosa sta cercando e per quale ragione. Deve quindi avere prima di tutto un visione del quadro generale e spesso è lui stesso a consigliare l'utilizzo di ulteriori colorazioni speciali, se lo ritiene necessario.

Alcune di queste indagini servono infatti per confermare un sospetto diagnostico (per esempio la presenza di determinati microrganismi), ma questo sospetto deve essere supportato dai rilievi dell'esame citologico/istologico di base. Inoltre, alcune di queste colorazioni (es. l'immunocitochimica per la differenziazione tra un linfoma B e un linfoma T), devono per forza essere precedute da una normale citologia: dobbiamo infatti essere certi prima di tutto che siamo realmente di fronte ad una neoplasia, poi possiamo procedere col tipizzarla.

Molti colleghi ad esempio, pensano che l'immunocitochimica serva per confermare il sospetto di linfoma: ciò non è sempre vero, soprattutto quando la popolazione cellulare nel campione è ancora mista e non uniforme. L'immunocitochimica per linfoma ha come unico scopo la differenziazione della linea cellulare di origine (B-cell vs T-cell). Inoltre, senza una stadiazione clinica e la citologia ed istologia di base, non vi permette nemmeno di gradare la neoplasia (indolente vs aggressiva).



*Figura 1 – Esempio di colorazioni immunocitochimica per linfoma.*

**2) Richiedere la PARR per differenziare una neoplasia linfoide da una forma reattiva, senza altre valutazioni di base:** anche questo strumento, se usato da solo, può facilmente condurre ad errori diagnostici.

La PARR infatti non ha una specificità ed una sensibilità assolute, per cui il risultato della PCR deve essere interpretato nel contesto dei dati clinici e di quelli patologici di base. Un altro errore che viene talora commesso, è quello di richiedere la PARR per la determinazione del fenotipo della neoplasia linfoide. Questo strumento serve per supportare o meno il sospetto di una neoplasia linfoide, non per determinarne il fenotipo (per questo scopo ci sono altri metodi, come la citometria a flusso, l'immunocitochimica e l'immunoistochimica). Ci sono infatti neoplasie

linfoproliferative B-cell che risultano clonali per il recettore T, e viceversa, o addirittura linfomi B o T che riarrangiano clonalmente entrambi i recettori T e B.

### **3) Richiedere esami ematobiochimici avanzati, senza un adeguato supporto clinico e di laboratorio di base.**

Anche in questo caso, può risultare alquanto fuorviante ricorrere a test particolari di “approfondimento” (ad esempio quelli ormonali): se ad esempio, un animale non ha segni clinici di Cushing e manca delle tipiche alterazioni di laboratorio di base, è abbastanza inutile ricorrere ai dosaggi del cortisolo pre e post-ACTH o dopo soppressione con desametasone. In caso di test positivo avremmo infatti una falsa conferma del nostro (sbagliato) sospetto clinico: infatti molti animali con malattie concomitanti iper-producono cortisolo, senza in realtà avere una vera e propria sindrome di Cushing. Situazione simile si rileva nel caso della misurazione del solo T4: molti animali malati hanno un T4 basso, ma senza i tipici segni clinici e la caratteristica ipercolesterolemia, è alquanto improbabile che il vostro paziente sia realmente ipotiroidico.

### **4) ricercare agenti eziologici in pazienti privi delle tipiche alterazioni clinico-patologiche per quella patologia:** molte malattie infettive, conducono a tipiche alterazioni di laboratorio degli esami di base.

Un animale con un quadro proteico perfettamente normale, difficilmente sarà affetto da leishmaniosi. Un cane con una conta ed una stima piastrinica perfettamente normale, quasi sicuramente non potrà avere la piroplasmosi. Per cui in due situazioni come queste, andare a cercare quell'agente eziologico con tecniche avanzate come la PCR, risulterà quasi sicuramente inutile e dovremmo invece indirizzare la nostra attenzione e i nostri sforzi diagnostici in altre direzioni.

**Walter Bertazzolo**, EBVS European Specialist  
in Veterinary Clinical Pathology (Dipl. ECVCP); Direttore Scientifico di MYLAV

## IL RUOLO DEI VIRUS NELL'ONCOGENESI DEI TUMORI DEL CANE

Che ruolo hanno i virus nell'eziopatogenesi delle neoplasie del cane? Uno studio appena pubblicato da ricercatori italiani, ha cercato di rispondere a questa domanda.

**Nell'uomo**, circa il 10-15% delle neoplasie sono associate ad infezioni virali, quali papillomavirus, virus di Epstein-Barr, virus dell'epatite B, virus di Kaposi, ecc.

**In medicina veterinaria** esistono diverse patologie virali con le medesime potenzialità (es. il **papilloma** virus del cane e il virus della **leucemia felina** del gatto, giusto per citarne un paio di interesse oncologico negli animali da compagnia).

Tuttavia, il ruolo di possibili infezioni virali di varia natura nella genesi dei tumori di diverso tipo, non è ancora stato indagato approfonditamente.



*Figura 1 – Metastasi polmonari in un cane con emangiosarcoma.*



Una recente review sistematica sull'argomento è stata pubblicata su *Frontiers in Veterinary Science* da due autori italiani, Diana Giannuzzi dell'Università di Padova e dal nostro consulente in patologia, il prof. Luca Aresu dell'Università di Torino.

Gli autori hanno selezionato tutti gli studi pubblicati in cui fosse stata applicata una tecnologia chiamata "Next Generation Sequencing" su campioni di neoplasie canine, al fine di ricercare la presenza di genomi virali integrati nel DNA delle cellule neoplastiche.

**Le neoplasie valutate includevano** casi di linfoma, carcinoma transazionale della vescica, emangiosarcoma splenico, melanoma, ameloblastoma acantomatoso, osteosarcoma, glioma, neoplasie mammarie e mastocitoma, per un totale di 285 campioni.

In questo gruppo di neoplasie gli autori non hanno identificato una associazione certa tra presenza di genoma virale e l'insorgenza della proliferazione tumorale.

Pertanto, il ruolo delle infezioni virali nell'eziopatogenesi di questo tipo di neoplasie canine è da considerarsi, allo stato attuale delle conoscenze, irrilevante.

**Luca Aresu**, Esperto MYLAV in patologia.

**Walter Bertazzolo**, EBVS European Specialist in Veterinary Clinical Pathology (Dipl. ECVCP); Direttore Scientifico di MYLAV

## **NODULI SPLENICI DEL CANE: QUANTI SONO REALMENTE NEOPLASTICI E MALIGNI?**

Questa è una domanda che mi assilla da anni e che mi fa discutere animosamente con gli amici clinici ed oncologi, ogni volta che affrontiamo l'argomento.

Vista la diffusione e la frequenza con cui si esegue la diagnostica per immagini dell'addome nei nostri animali, è evidente a tutti quanto sia un riscontro frequente, soprattutto per chi si occupa di ecografia. Non è una domanda a cui possiamo dare una risposta certa, ma cercherò di analizzare la questione in maniera critica in questo post.

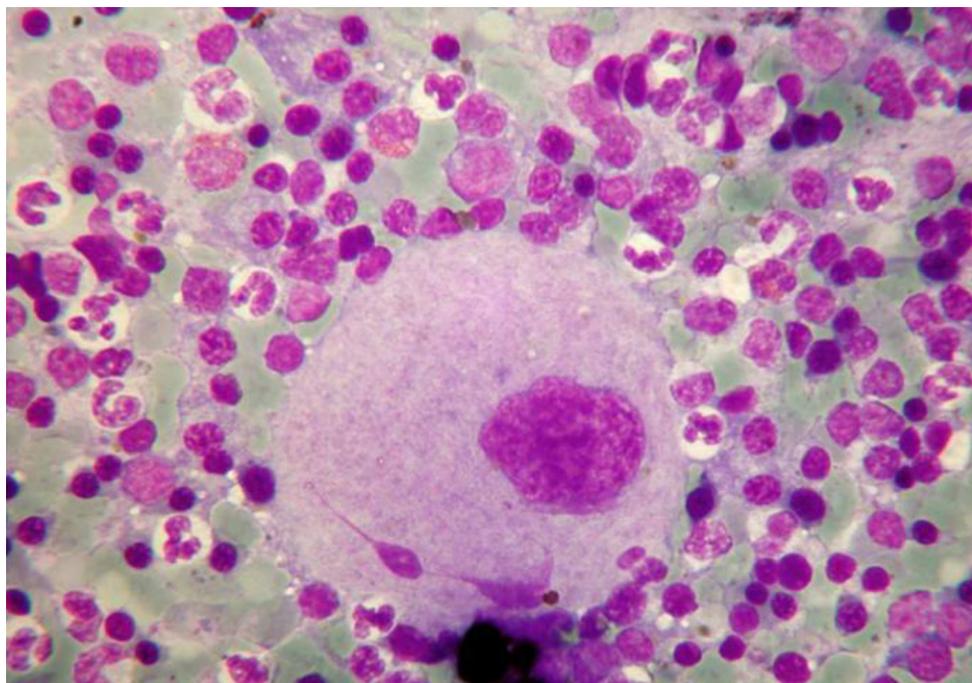
Nell'ultimo trentennio, diversi lavori pubblicati su riviste internazionali, hanno cercato di rispondere alla questione in maniera oggettiva e scientifica. La maggior parte di questi studi indica che una buona maggioranza delle neoformazioni nodulari spleniche sono neoplastiche e maligne (neoplasie vascolari e mesenchimali di varia natura, ematopoietiche, metastasi, ecc.): tra queste, l'emangiosarcoma (HSA) sembra farla nettamente da padrone.

Per gli oncologi esiste il dogma dei 2/3: ovvero i 2/3 circa delle neoformazioni spleniche sono neoplastiche e di queste, circa i 2/3 sono HSA.

Nella mia esperienza di "povero citologo" invece mi trovo in una situazione completamente opposta: la stragrande maggioranza dei campioni citologici che analizziamo in laboratorio, sono riconducibili a processi di iperplasia linfoide ed ematopoiesi extra-midollare splenica, del tutto benigni e spesso privi di significato clinico nel cane.

Nel nostro laboratorio, analizziamo ormai circa un migliaio di campioni splenici all'anno mediante FNA: posso dire con certezza che il numero di HSA da me diagnosticati si può contare sulle dita di una mano nell'arco di 12 mesi! Come è possibile questa spiegare discrepanza?

Le pubblicazioni sull'argomento hanno purtroppo dei grossi "bias" (ovvero dei difetti nella progettazione dello studio, che ne indirizzano in un modo o nell'altro i



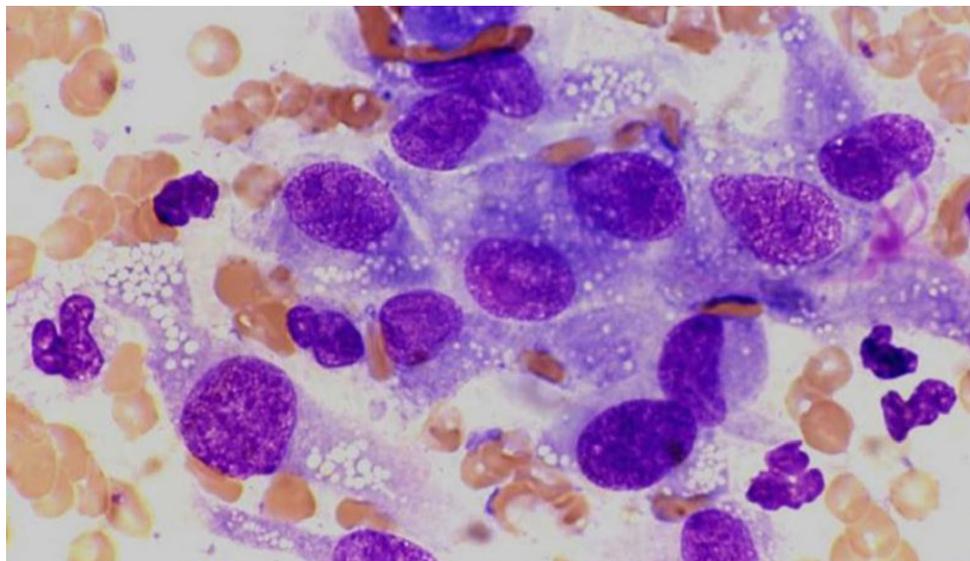
*Figura 1 – Esempio di citologia da nodulo di iperplasia linfoide ed ematopoiesi extramidollare splenica. In questi campioni si rileva una commistione di cellule linfoidi (come in un linfonodo reattivo) e di precursori ematopoietici misti (come in un midollo osseo).*

risultati): questi inficiano pesantemente l'interpretazione di quanto viene rilevato. Facciamo alcuni esempi di seguito.

Nel 2008 su JAVMA, Hammond et al. analizzano la prevalenza dell'HSA in 71 cani con massa splenica ed emoperitoneo; tutti questi pazienti hanno necessitato di una trasfusione. Ebbene di questi 71 casi, ben 54 avevano neoplasie maligne (di cui 50 HSA) e solo 17 lesioni benigne.

È lampante che in una simile popolazione di cani, sia molto più probabile rilevare una diagnosi finale di HSA rispetto alle altre neoplasie o noduli benigni, proprio perché questa neoplasia è più propensa a provocare un'emoaddome. Le lesioni

iperplastiche benigne solo occasionalmente vanno incontro ad una rottura spontanea, per cui la loro prevalenza in un gruppo selezionato sulla base della presenza di un versamento emorragico addominale, risulta ovviamente più bassa.



*Figura 2 – Classico aspetto citologico di un HSA.*

Nel 2016 Cleveland & Casale pubblicano uno studio su JAVMA in cui analizzano la tipologia di noduli splenici in cani splenectomizzati a seguito del riscontro “accidentale” di tali lesioni nella milza. In questi pazienti con noduli “non rotti” e quindi senza emoperitoneo, ecco che il rapporto tra lesioni maligne e benigne si ribalta: su 105 campioni, 74 risultavano benigni mentre 31 maligni (e di questi circa 2/3 erano HSA, confermando la maggior frequenza di questo tipo di neoplasia tra i tumori splenici del cane).

Perché la situazione si è capovolta rispetto allo studio precedente? Semplicemente perché la selezione della popolazione canina nello studio è differente: i noduli sono integri, non c'è emoperitoneo e il rilievo è accidentale (per cui i pazienti possono anche essere completamente asintomatici). In questo contesto è ovvio che la prevalenza delle lesioni benigne aumenta.



Altri studi, basati sempre su una diagnosi definitiva istologica, hanno mostrato prevalenze variabili tra lesioni benigne e maligne: Eberle et al (Tierärztliche Praxis 2012) su 249 campioni rilevano 47% di lesioni benigne e 53% maligne (con la consueta prevalenza di HSA, che rappresentava circa i 3/4 di queste neoplasie in questa serie).

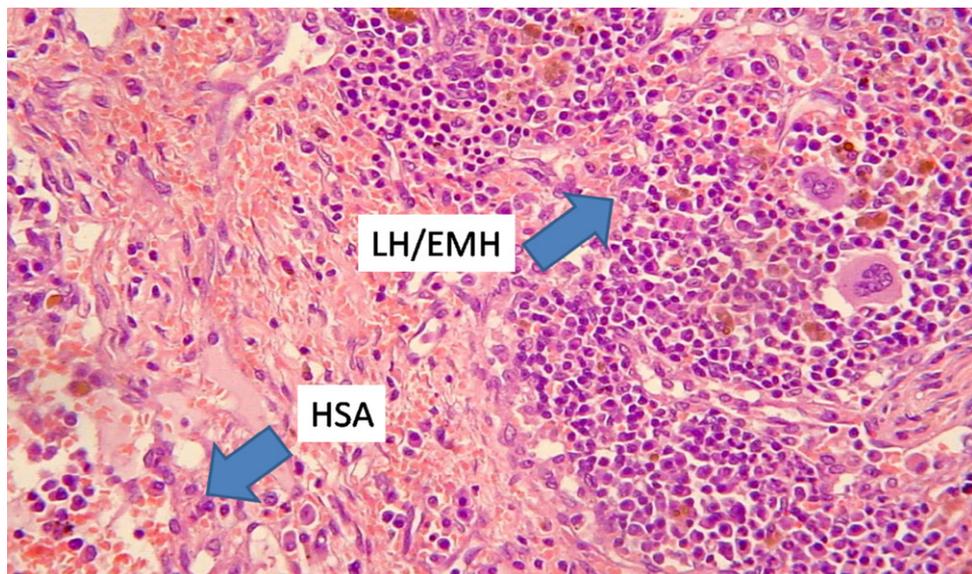
In uno storico studio del 1992 pubblicato da Spangler & Culbertson, su ben 1480 campioni istologici analizzati, la maggior parte delle lesioni analizzate erano benigne (iperplasia, ematomi ed ematopoiesi extramidollare) mentre nel recente lavoro pubblicato da Davies & Taylor nel 2020 sul Vet Comp Oncol, su 230 casi, il 60% circa erano neoplasie maligne, di cui 2/3 come al solito veniva rappresentato dall'HSA. Anche in questo lavoro tuttavia, se si consideravano solo i campioni non associati ad emoaddome, le lesioni benigne erano prevalenti (54% benigne VS 46% maligne).

In ogni caso, tutti questi numeri tendono a non supportare la mia "impressione" di citologo: le diagnosi di neoplasia maligna nella mia casistica sono nettamente più rare rispetto a quelle di malignità. Ho sempre pensato che questa discrepanza possa essere spiegata col fatto che i noduli benigni vengono lasciati in sede e monitorati, per cui giungono all'esame istologico in prevalenza le neoplasie maligne, e questo ne spieghi la sovra-rappresentazione negli studi pubblicati, che si basano quasi esclusivamente su una diagnosi finale di tipo istologico.

Questa mia impressione è stata finalmente supportata da un recente studio pubblicato da Yankin et al su J Vet Intern Med (2020): in questo articolo gli autori hanno selezionato 125 casi di citologie da milze con alterazioni ecografiche del parenchima o con noduli splenici <2 cm. Di questi 125 casi, solo 22 erano neoplastici ed in prevalenza linfomi (10 casi) e solo 1 HSA! La stragrande maggioranza dei campioni era quindi da ricondurre ad alterazioni non neoplastiche, di cui 100 considerate clinicamente irrilevanti.

È ovvio che anche in quest'ultimo lavoro ci sono bias importanti: per esempio avere escluso le lesioni di dimensioni >2 cm potrebbe aver fatto sottostimare alcune forme neoplastiche rispetto ad altre. Inoltre, non avendo una conferma istologica, è altrettanto possibile che alcune lesioni apparentemente benigne all'esame citologico nascondano una neoplasia (per esempio un'iperplasia linfoide diagnostica-

ta in citologia, potrebbe rivelarsi invece un linfoma con crescita nodulare all'esame istologico, oppure una ematopoiesi extra-midollare nascondere un HSA).



*Figura 3 – Esame istologico di un nodulo splenico, in cui prevalevano gli aspetti di iperplasia linfoide (LH) ed ematopoiesi extra-midollare (EMH), ma in un'area limitrofa era presente una proliferazione angiosarcomatosa (nell'angolo in basso a sinistra si intravede una porzione periferica della neoplasia, HSA).*

Non credo di aver dato una risposta definitiva alla domanda iniziale, in quanto altri studi con casistiche molto più estese, saranno necessari per avere più chiara la situazione. Ma almeno abbiamo incominciato a mettere in discussione la regola dei 2/3 tanto amata dagli oncologi.

Non solo: una volta che saranno meglio chiarite le reali prevalenze delle patologie spleniche nodulari del cane, sarà possibile avere delle linee guida condivise su come gestirle clinicamente (monitorarle VS intervenire chirurgicamente ad esempio).

**Walter Bertazzolo**, EBVS European Specialist in Veterinary Clinical Pathology (Dipl. ECVCP); Direttore Scientifico di MYLAV.

## RETROVIROSI FELINE (FIV E FELV): LE NUOVE LINEE GUIDA 2020 DELL'AMERICAN ASSOCIATION OF FELINE PRACTITIONERS (AAFP)

Recentemente il Journal of Feline Medicine and Surgery ha pubblicato un aggiornamento sulle retrovirusi feline, con le relative guidelines per la gestione clinica (Little et al, Journal of Feline Medicine and Surgery 2020; 22: 5–30). Queste nuove linee guida rappresentano le indicazioni più aggiornate della AAFP: cercherò di riassumervi in questo post i dati più salienti e le novità rispetto al passato.

Si stima che la prevalenza delle infezioni retrovirali si attesti intorno al 2-4% sia per FIV che per FeLV in alcuni studi europei e nord-americani, mentre appare più elevata in studi condotti in Australia, Asia, sud Europa e sud America/Caraibi (fino al 12-15%). Queste virusi sono quindi sempre di estrema attualità per i clinici che si occupano di medicina felina.

Infezione (via oronasale+++; verticale, morsi, accoppiamento)



RNA virale rilevabile a 7 gg circa



DNA provirale rilevabile a 15 gg circa



Antigene virale rilevabile a 30 gg circa

*Figura 1 – Schema della patogenesi dell'infezione da FeLV.*

In relazione all'infezione da **FeLV**, le attuali linee guida distinguono queste tre categorie di soggetti che vengono in contatto con il virus (come da Figura 1):

- Pazienti con **infezione abortiva** (ex regressor, da precedenti linee guida): i gatti si infettano ma sviluppano solo anticorpi neutralizzanti; non presentano quindi né viremia (test antigenico su sangue negativo), né DNA e RNA in sangue,

midollo o secreti. Questi pazienti hanno quindi eliminato l'infezione oppure la quantità di virus presente è irrilevabile con le attuali metodiche di rilevazione.

- Pazienti con **infezione regressiva** (ex infezioni latenti, da precedenti linee guida): questi pazienti sviluppano anticorpi neutralizzanti, risultano positivi a DNA provirale (virus integrato nelle cellule dell'ospite), ma sono negativi ai test antigenici e all'RNA in sangue e secrezioni (ovvero non sono viremici né eliminatori). Questi pazienti hanno contratto l'infezione che rimane latente allo stato di provirus nelle cellule del gatto. Possono rimanere tali a tempo indeterminato, oppure evolvere a una fase di viremia consolidata (infezione progressiva, vedi oltre).
- Pazienti con **infezione progressiva** (ex viremia persistente, da precedenti linee guida): questi gatti mantengono test antigenico positivo, oltre che DNA e RNA rilevabili in sangue, midollo e secreti. Sono quindi persistentemente infetti ed eliminatori. Questi sono pazienti a maggior rischio di sviluppare patologie correlate con il FeLV.

A parte il discorso relativo alle diverse terminologie utilizzate, emerge un dato interessante: una volta infettato dal virus FeLV, l'esito dell'infezione può essere differente (vedere Figura 2).

In passato si supponeva che tra i gatti infettati, esistesse una simile proporzione tra soggetti con infezione abortiva, regressiva e progressiva. Gli studi più recenti mostrano invece che i gatti con infezioni abortive sarebbero molto più rappresentati, ad eccezione di quelle condizioni in cui esiste una forte pressione da parte dell'agente virale (es. gruppi di gatti infetti e non, che convivono strettamente e continuamente, come nelle colonie).

Da questo dato ne deriva che un singolo test positivo (antigenico o molecolare), soprattutto se in un soggetto giovane, non deve necessariamente essere considerato come indicatore di una malattia consolidata, in quanto molti gatti riescono ad eliminare l'infezione o a mantenerla sotto controllo.

Test multipli e ripetuti nel tempo possono quindi essere consigliabili in alcuni pazienti, o in caso di risultati contrastanti o dubbi.

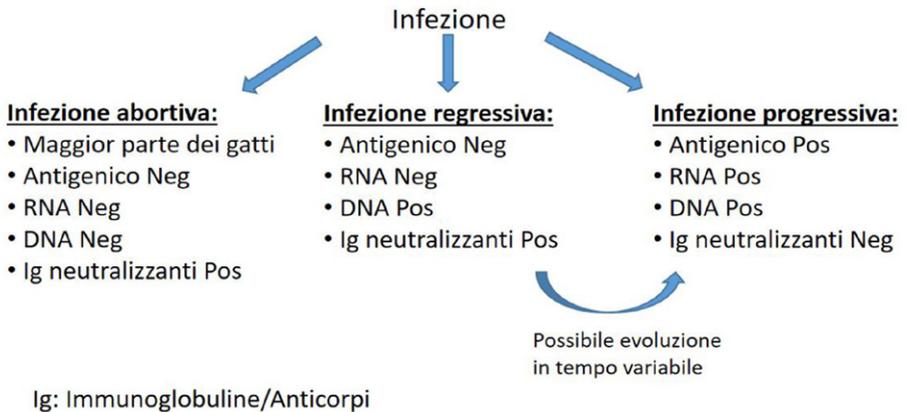


Figura 2 – Esempio schematico degli scenari conseguenti all'infezione con FeLV.

In relazione alle **modalità di trasmissione** delle due virosi, si sottolinea l'importanza e la preponderanza della via orale/salivare (es. condivisione di ciotole per cibo ed acqua) per il FeLV e di quella mediante morsi/combattimenti per il FIV (Figure 1 e 3).

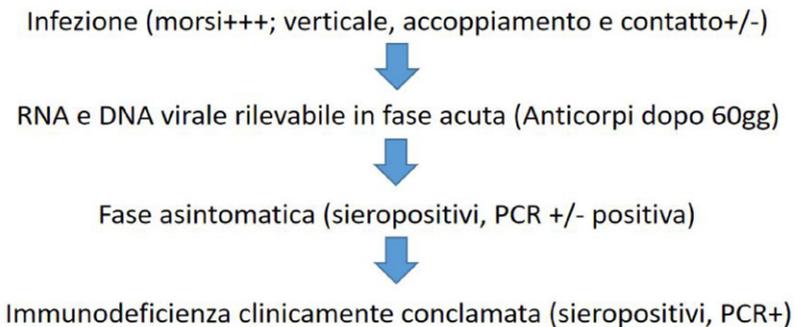


Figura 3 – Schema della patogenesi dell'infezione con FIV.



Data l'importanza dell'individuazione e della separazione dei gatti infetti da quelli esenti, le nuove linee guida pongono molta attenzione sull'utilizzo dei test diagnostici. In realtà non ci sono grandi novità rispetto a quanto già pubblicato sui nostri precedenti blog sull'argomento, a cui vi rimandiamo per i consigli pratici:

<https://www.mylavblog.net/generica/148-148.html>

<https://www.mylavblog.net/generica/126-126.html>

Si sottolinea sempre di tener conto dei tempi di incubazione delle due infezioni, in modo da evitare possibili falsi negativi, oltre che di considerare l'interferenza degli anticorpi materni per quanto riguarda l'esame sierologico per FIV (possibili falsi positivi fino a 6 mesi di età). Per valutare questi potenziali falsi positivi alla FIV, il test andrebbe quindi ripetuto dopo i 6 mesi di età, oppure andrebbe effettuata direttamente una PCR di conferma (che rilevando direttamente il genoma virale, non risente degli anticorpi passivi di derivazione materna).

Nei paesi in cui è disponibile la vaccinazione per la FIV, si deve considerare il possibile effetto della risposta vaccinale sul risultato del test anticorpale per FIV: mentre alcuni kit rapidi non subiscono l'interferenza degli anticorpi vaccinali, altri esitano in risultati falsamente positivi (se effettuati entro 6 mesi dal vaccino), per cui è importante in questi pazienti, conoscere lo stato vaccinale e la specificità del kit utilizzato. Questa interferenza non sussiste invece per l'eventuale vaccinazione contro FeLV: i test rapidi individuano gli antigeni virali specifici e non la risposta anticorpale del gatto e non danno cross-reazione con gli antigeni usati nei vaccini. Ovviamente le vaccinazioni non hanno alcun effetto interferente sui test molecolari mediante PCR, sia per FIV che per FeLV.

Molta enfasi viene riservata sulle misure preventive; innanzi tutto vengono identificati fattori, ben conosciuti, che favoriscono la diffusione delle due retrovirusi tra le popolazioni di felini, quali ad esempio: sesso maschile, tendenza all'aggressività e ai combattimenti, accesso all'esterno e contatto con gatti infetti, contatto sessuale, trasmissione da madre infetta (quest'ultima più importante per FeLV che per FIV). Si sottolinea pertanto l'importanza dell'individuazione e della segregazione dei soggetti infetti, o dallo stato retrovirale sconosciuto, da quelli sani sicuramente negativi.



La vaccinazione contro FeLV ha dimostrato efficacia nella protezione contro l'infezione (riduzione del rischio di infettarsi mediante il contatto con gatti FeLV-positivi) ma anche nel ridurre la probabilità di un'evoluzione verso la malattia progressiva. Si sconsiglia invece l'utilizzo della vaccinazione FeLV in gatti già infetti, in quanto inutile (oltre che potenzialmente rischiosa per altri effetti avversi al vaccino).

Tutti i gatti e gli adulti a rischio di infezione, andrebbero quindi testati e, se negativi, vaccinati contro la FeLV. La prima vaccinazione andrebbe effettuata a partire dall' 8<sup>a</sup> settimana di età, con un richiamo dopo 20-30 giorni e successivamente con ulteriori richiami annuali oppure ogni 2-3 anni in base a rischio di contagio e al tipo di vaccino usato. Di seguito uno schema riassuntivo di quanto dettato dalle linee guida.

#### **Linee guida vaccinali 2020 della AAFP per la FeLV:**

- Somministrare il vaccino FeLV a tutti i gatti a rischio di infezione
- Testare i gatti prima della vaccinazione
- Vaccinare solo i negativi
- Somministrare primo vaccino dalla 8<sup>a</sup> settimana di età
- Richiamare dopo 3-4 settimane
- Effettuare il boost dopo circa 1 anno
- **Non rivaccinare** gatti senza rischio di infezione (es. gatti che vivono da soli in casa o in con gatti sicuramente FeLV-negativi, gatti che non escono mai e non hanno contatti con altri felini, ecc.)
- **Vaccinare annualmente** gatti che hanno elevato rischio di infezione (non sterilizzati e con possibilità di accesso all'esterno, contatto con altri gatti FeLV-positivi o dallo stato FeLV sconosciuto, ecc.)
- **Vaccinare ogni due anni** gatti che hanno accesso all'esterno ma con basso rischio di esposizione con gatti FeLV-positivi o con stato FeLV sconosciuto



La vaccinazione contro la FIV invece ha mostrato risultati più questionabili: il vaccino per FIV è disponibile solo in alcuni paesi ed è comunque considerato “non-core”. Inoltre si deve ricordare il possibile effetto interferente nei confronti dei test sierologici nei gatti vaccinati per FIV.

L’infezione con questi retrovirus non significa necessariamente una riduzione marcata dell’aspettativa di vita, in particolare per quella con FIV.

I gatti FIV e/o FeLV positivi possono andare incontro a numerose condizioni patologiche che vengono favorite dall’infezione virale persistente: infezioni opportuniste di varia natura, infestazioni micotiche, neoplasie, patologie immuno-mediate, ecc. Pertanto questi pazienti andrebbero individuati e mantenuti in condizioni tali da ridurre il rischio di trasmissione della retrovirus ad altri gatti, ma anche di ridurre il rischio di contrarre patologie favorite dallo stato di immuno-depressione (es. una micoplasmosi trasmessa dal morso di pulci mediante il controllo periodico degli ectoparassiti).

Questi pazienti andrebbero sterilizzati, oltre che rivalutati clinicamente e mediante un check-up di laboratorio ogni 6 mesi.

Quando si valutano pazienti malati e positivi a una infezione retrovirale, bisogna sempre domandarsi se i sintomi e le alterazioni clinico-patologiche osservate, possano essere più o meno correlabili con l’infezione (vedi tabella 1), per evitare errori diagnostici e di gestione clinica.

Non correlabili a FIV/FeLV	Potenzialmente secondarie a FIV/FeLV	Direttamente correlabili a FIV/FeLV
Patologie feline chiaramente non legate a una infezione retrovirale (es. Una patologia endocrina, una malattia renale, ecc.)	Patologie feline che possono essere facilitate da una immuno-deficienza indotta dal retrovirus (es. Infezioni, gengivo-stomatiti, neoplasie ematopoietiche, ecc.)	Patologie direttamente causate dal retrovirus:  FeLV: citopenie da patologia midollare, linfomi/leucemie, patologie neurologiche  FIV: immuno-soppressione, patologie neurologiche

*Tabella 1 – Definire le cause dei segni clinici in gatti infetti da retrovirus*



L'utilizzo di farmaci antivirali (come la zidovudina) o dell'interferone è stato proposto in gatti retrovirus-positivi e con patologie correlabili all'infezione. Tuttavia le evidenze scientifiche sulla reale utilità di queste terapie è questionabile.

Per coloro che fossero interessati ad approfondire l'argomento, vi invito a leggere l'articolo originale.

**Walter Bertazzolo**, EBVS European Specialist in Veterinary Clinical Pathology (Dipl. ECVCP); Direttore Scientifico di MYLAV



## **ERRORI DA EVITARE: IL GEL ECOGRAFICO, AMICO DEL RADIOLOGO, NEMICO DEL CITOLOGO**

Molti radiologi ancora sottovalutano quanto deleterio possa essere il gel utilizzato per le indagini ecografiche, sui campioni citologici ottenuti per via eco-guidata.

Se non volete ottenere campioni citologici inutili, ecco qualche consiglio pratico.



*Figura 3 – Prelievo per FNA eco-guidato. Foto per gentile concessione di Federica Rossi, EBVS European Specialist in Veterinary Diagnostic Investigation (Dipl. ECVDI).*

Quando eseguite campioni per agoaspirazione eco-guidati, se state utilizzando gel ecografico in abbondanza, è molto probabile che parte di questo materiale finisca per mescolarsi con il materiale raccolto nell'ago.

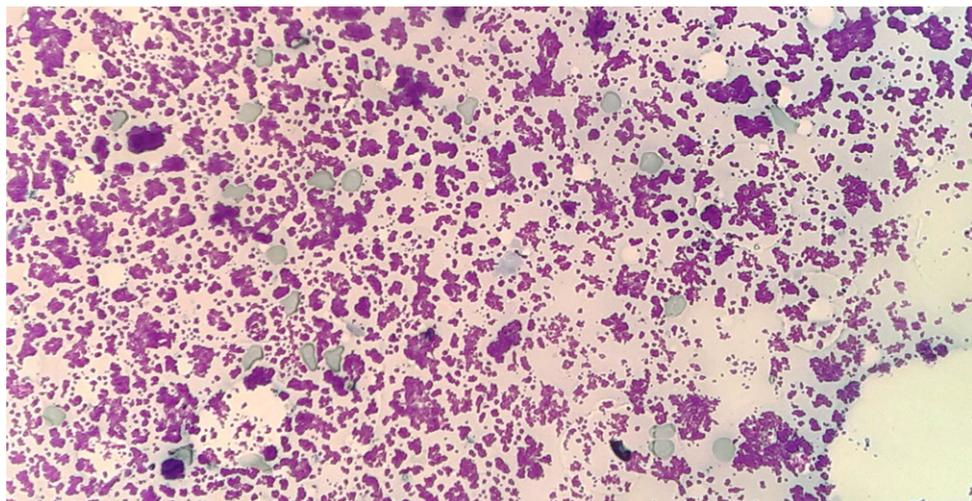
Quando deponete il vostro campione sul vetrino per strisciarlo, il gel verrà strisciato con le cellule campionate nell'ago. Vi sembrerà probabilmente di aver ottenuto un ottimo campione, perché il gel assomiglia macroscopicamente a quei prelievi di ottima cellularità, anche dopo colorazione (Figura 2).



*Figura 2 – Striscio con abbondante materiale viola colorato (gel ecografico).*

L'effetto che ne otterrete all'esame citologico è mostrato nella figura successiva (Figura 3): abbondante materiale fucsia particolato ed eterogeneo, che copre qualsiasi cosa.

In un prelievo così, è impossibile poter effettuare una valutazione microscopica, il campione risulterà pertanto non diagnostico e quindi inutile.



*Figura 3 – Aspetto microscopico del gel ecografico dopo la colorazione con le normali metodiche citologiche.*

## Come fare per evitare questo effetto deleterio?

Bisogna eliminare per bene il gel dalla cute prima di effettuare i prelievi per ago-aspirazione. Una volta che avete terminato le vostre valutazioni morfologiche ed eventuali misurazioni, asportate tutto il gel; poi utilizzate un altro mezzo liquido per ottimizzare il contatto tra sonda ecografica e cute, per ottenere una guida ecografica alla biopsia citologica.

L'ideale è del banale alcool, ma se avete il timore di poter danneggiare la sonda, anche della fisiologica può andare bene.

**Walter Bertazzolo**, EBVS European Specialist in Veterinary Clinical Pathology (Dipl. ECVCP); Direttore Scientifico di MYLAV.

## **PERCHÈ È IMPORTANTE L'ISTOLOGICO LINFONODALE DELL'ITER DIAGNOSTICO DI UN SOSPETTO LINFOMA?**

Perché gli oncologi richiedono ormai routinariamente la biopsia linfonodale in un caso di sospetto linfoma? La sola citologia non è sufficiente per una diagnosi definitiva di neoplasia? Cosa può aggiungere di più un istologico? Cerchiamo di fare un po' di chiarezza in questo post.

Quando ci si appropria ad un paziente con linfadenomegalia generalizzata e con sospetta neoplasia linfo-proliferativa, oltre agli esami di base (ematobiochimica, elettroforesi, esame urine ed eventuali sierologie in caso di sospette malattie infettive) è assolutamente necessario ricorrere ad una citologia per agoaspirazione dei linfonodi colpiti.

In una buona percentuale di casi (soprattutto nei cani, in cui predominano i linfomi B diffusi e a grandi cellule), l'esame citologico è sufficiente per emettere una diagnosi di linfoma o comunque di neoplasia ematopoietica.

Se questo approccio era considerato sufficiente negli anni '80 e '90 per instaurare una terapia, con il crescere delle conoscenze, ci si è resi conto che molte altre informazioni sono necessarie per definire meglio quale neoplasia ematopoietica stiamo affrontando e quindi quale possa essere la terapia migliore, oltre che poter emettere una prognosi. In questo contesto la fenotipizzazione e la stadiazione clinica completa assumono un ruolo fondamentale.

Ma perché allora molti oncologi suggeriscono comunque di effettuare una biopsia linfonodale escissionale per definire ancora meglio la patologia neoplastica? I motivi sono molteplici e cercheremo di riassumerli con una serie di esempi di seguito.

Bisogna innanzitutto sottolineare che quando si esegue una biopsia linfonodale, è molto importante evitare biopsie tru-cut o incisionali/cuneiformi, in quanto in caso di una proliferazione neoplastica non diffusa (es. un linfoma follicolare o della zona T), c'è il rischio che il patologo abbia grosse difficoltà ad interpretare il quadro ed

a distinguere una patologia reattiva da una neoplastica. In secondo luogo, in caso di una forma diffusa che interessi un po' tutti i linfonodi esplorabili, è consigliabile asportare sicuramente un linfonodo più accessibile (es. un popliteo) ed evitare possibilmente i mandibolari (a meno che siano gli unici coinvolti), più facilmente affetti da forme di grave iperplasia (per la vicinanza con il cavo orale), che possono mettere in difficoltà il patologo in un diagnostico differenziale tra neoplasia e forma reattiva.



*Figura 1 – Immagine intra-operatorio di linfoadenectomia mandibolare, per gentile concessione del Prof. Paolo Buracco, EBVS European Specialist in Veterinary Surgery (Dipl. ECVS).*

Vediamo alcuni scenari in cui la biopsia escissionale di un linfonodo può rivelarsi risolutiva o comunque molto utile:

**Scenario 1** – Un linfoma B a grandi cellule in cui il tessuto linfonodale normale non è ancora stato completamente sostituito dalla popolazione neoplastica. In questo

caso la citologia può avere difficoltà nel distinguere una grave iperplasia follicolare da una neoplasia. Basta una semplice variazione nel posizionamento dell'ago, che potremmo campionare un eccesso di cellule voluminose o di più piccole. In casi dubbi è pertanto sempre raccomandabile una conferma con istologia. Quest'ultima ha la possibilità di valutare l'architettura globale del linfonodo che, se sovvertita, è indicativa di una neoplasia.

**Scenario 2** – Un linfoma T-zone (“small clear”, “hand-mirror” o come preferite chiamarlo in citologia...) VS una iperplasia della paracorticale. Ci sono casi di iperplasia della zona T/paracorticale che citologicamente possono facilmente mimare un linfoma indolente di questo tipo. L'istologia vi può dare una risposta certa nella maggior parte dei casi.

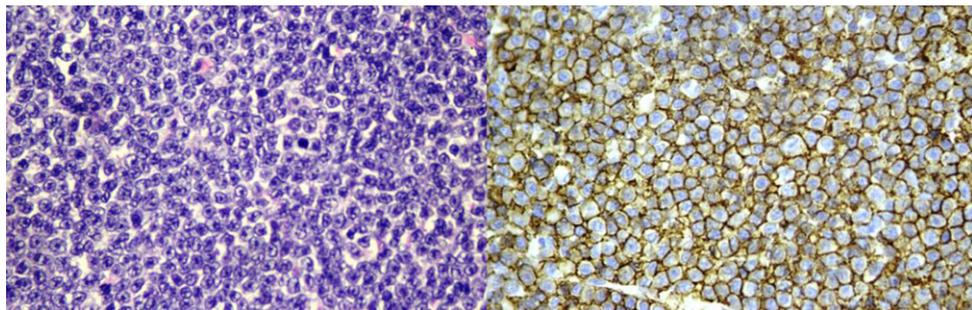
**Scenario 3** – Un linfoma follicolare: questi rari linfomi sono praticamente impossibili da diagnosticare in citologia: vedreste un quadro misto, sovrapponibile a quello di una iperplasia follicolare. Per cui se la citologia vi emette una diagnosi di forma reattiva ma la linfadenomegalia persiste o peggiora, l'istologico è sicuramente la scelta da fare.

**Scenario 4** – I linfomi del gatto...il terrore dei citologi: molti linfomi felini sono veramente difficili da diagnosticare con certezza mediante citologia. Ad esempio il così detto “Hodgkin-like” (che poi sarebbe un linfoma B a grandi cellule con un infiltrato misto di linfociti T, istiociti e granulociti), può venir sospettato da un occhio citologico esperto, ma deve essere confermato dalla biopsia istologica.

**Scenario 5** – I linfomi della zona marginale (così detti “macro-nucleolated medium sized cells” in citologia): anche questi possono facilmente essere confusi con una iperplasia della stessa zona marginale in citologia.

Senza un istologico di conferma non si possono diagnosticare con facilità. Inoltre la fenotipizzazione con citofluorimetria da sola, in questi casi vi direbbe che si tratta di un linfoma B: ma questo non è un linfoma B ad alto grado, come il classico DLBCL (Diffuse Large B Cell Lymphoma) del cane, bensì una neoplasia indolente.

Senza l'istologia di conferma definitiva, potremmo fare degli errori di gestione non solo da un punto di vista terapeutico, ma anche di inquadramento prognostico. Ad esempio, mentre per il linfoma DLBCL un'infiltrazione del midollo >3% si accompagna ad una prognosi sfavorevole, per il linfoma della zona marginale, tale cut-off è posto al 20%. Senza diagnosi istopatologica e alla percentuale di infiltrazione midollare citometrica, è impossibile dare informazioni prognostiche al proprietario.



*Figura 2 – Esempio di aspetto istologico ed immuno-istochimico (a destra, mediante colorazione anti-CD20) di linfoma B a grandi cellule (DLBCL) del cane. Per gentile concessione di Silvia Benali, EBVS European Specialist in Veterinary Pathology (DiplECVP).*

In conclusione, sebbene i protocolli terapeutici personalizzati siano ancora nella loro fase embrionale, il comportamento biologico dei diversi istotipi inizia ad essere svelato. In linea con l'oncologia umana, assisteremo presto a protocolli terapeutici personalizzati, che non terranno conto soltanto dello stadio clinico e del fenotipo, ma anche dell'istotipo e verosimilmente delle caratteristiche molecolari dei diversi linfomi.

**Laura Marconato**, EBVS European Specialist in Veterinary Small Animal Oncology (Dipl. ECVIM-Oncology), Esperto MYLAV.

**Walter Bertazzolo**, EBVS European Specialist in Veterinary Clinical Pathology (Dipl. ECVCP); Direttore Scientifico di MYLAV.

## LA POLIARTRITE IMMUNO-MEDIATA: COME FACCIAMO A FARE LA DIAGNOSI?

La poliartrite immuno-mediata è una patologia tanto comune quanto sotto-diagnosticata e sottovalutata nella pratica. Il problema principale è che la maggior parte dei clinici si immagina che questa patologia determini sempre gravi alterazioni morfologiche e funzionali articolari.

Non è così: molti cani e gatti con poliartrite immuno-mediata hanno come unici segni clinici l'ipertermia e l'abbattimento.

Il primo step è quindi sospettarla sempre in questi casi e poi procedere con gli accertamenti indicati per una diagnosi definitiva. Con questo blog, cerchiamo di darvi alcuni consigli pratici per raggiungere questo obiettivo.

La poliartrite è per definizione una flogosi, che interessa due o più articolazioni: ma cosa intendiamo nello specifico quando parliamo di poliartriti immuno-mediate? Si tratta di una malattia poli-articolare (o meglio un gruppo di malattie) di tipo infiammatorio, nella cui patogenesi gioca un ruolo fondamentale il sistema immunitario.

È infatti comunemente accettato che un meccanismo di ipersensibilità di tipo III porti alla formazione di immuno-complessi circolanti e successivamente ad un loro deposito a livello articolare, causando un'attivazione a cascata del complemento che scatena la risposta infiammatoria. Quest'ultima esita nel richiamo di numerosi granulociti neutrofili (oltre a più rari linfociti e macrofagi) nella membrana sinoviale e quindi nel liquido sinoviale. In alcuni casi più rari, la risposta è invece cellulosa-mediata (ipersensibilità di IV tipo) ed è quindi mediata principalmente da linfociti.

Le cause che possono portare a questa attivazione del sistema immunitario sono estremamente varie, e permettono di classificare le poliartriti immuno-mediate in:

- Poliartriti immuno-mediate di tipo **infettivo**, in cui lo stimolo immunogeno/antigenico, di natura batterica, protozoaria o virale, si trova all'interno dell'articolazione. Si tratta delle forme più frequenti nel gatto (es. da FIP, micoplasmi o calicivirus). Nel cane sono spesso associate a Leishmaniosi.

- Poliartriti immuno-mediate di tipo **reattivo**, in cui lo stimolo immunogeno è “lontano dall’articolazione” e può essere identificato nelle malattie più disparate, nonché in reazioni avverse a farmaci e vaccini. L’antigene che causa la formazione di immuno-complessi può pertanto essere un principio attivo (es. un antibiotico), un vaccino, un antigene neoplastico (in caso di concomitanti neoplasie), o di derivazione alimentare/batterica in caso di enteropatie.
- Poliartriti immuno-mediate **primarie o idiopatiche**, per le quali fondamentalmente non è possibile identificare una causa scatenante, e vengono quindi diagnosticate per esclusione. È la tipologia più frequente nel cane. Sono ulteriormente suddivise in forme non erosive ed erosive in base all’aspetto radiografico delle articolazioni colpite. Nelle prime, all’esame radiografico si osserva solamente tumefazione dei tessuti molli ed eventuale aumento delle rime articolari per un possibile accumulo di liquido. Nelle seconde, (più frequenti nel gatto), si rilevano invece alterazioni erosive e proliferative progressive a carico dei tessuti osteo-cartilaginei e sono particolarmente gravi e con prognosi più riservata.

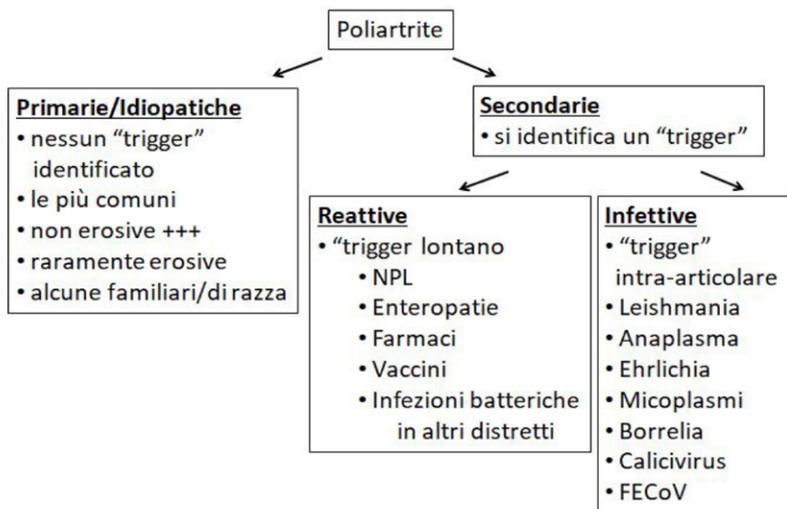


Figura 1 – Schema riassuntivo delle potenziali cause di poliartrite nel cane e nel gatto.

Partendo dal presupposto che si tratta di malattie molto frequenti, in particolare nel cane, quando dobbiamo sospettarle e quindi indagarle? Il segnalamento tipico è quello di un paziente giovane/adulto, con segni clinici aspecifici e tipicamente intermittenti quali:

- Rigidità
- Difficoltà ad alzarsi
- **Zoppia**
- **Articolazioni tumefatte, calde e dolenti**
- Letargia
- Depressione
- Anoressia
- Linfadenomegalia
- Pu/Pd
- **Febbre** (secondo alcuni autori le poliartriti immuno-mediate sono la causa di **almeno il 50%** delle febbri di origine sconosciuta nel cane!)
- Eventuali segni riferibili alla malattia primaria (in caso di forme reattive)

È importante ricordare che non tutti questi segni clinici siano sempre presenti, anzi!

Contrariamente a quanto si può pensare, per esempio, **i cani con poliartrite spesso non zoppicano e non presentano gonfiore delle articolazioni.**

Anche quest'ultimo segno, quando presente, non coinvolge necessariamente tutte le articolazioni; sembrano infatti essere maggiormente colpite quelle distali (carpo, tarso, interdigitali, ginocchio e gomito), ma è possibile anche un coinvolgimento ad esempio solo del gomito o del rachide come unico segno.

**La febbre è il segno cardine! Ogni cane o gatto con FUO (Fever of Unknown Origin) andrebbe indagato per una possibile poliartrite.**

In alcuni casi la poliartrite immuno-mediata si inserisce in un contesto infiammatorio più vasto, in cui si associano meningite e dolorabilità muscolare più o meno diffusa.

La diagnosi definitiva di una poliartrite immuno-mediata, oltre che sul sospetto clinico, si basa sull'**esame citologico** del liquido sinoviale, prelevato tramite artrocentesi da almeno 4 diverse articolazioni a prescindere dai segni clinici. L'alterazione che si riscontra è una **flogosi neutrofilica non settica** che può essere accompagnata da altri reperti macroscopici (aumento della torbidità, diminuzione della viscosità) e microscopici (aumento dei sinoviociti, cellule LE in corso di SLE, aumento e prevalenza di linfociti in alcune più rare forme).

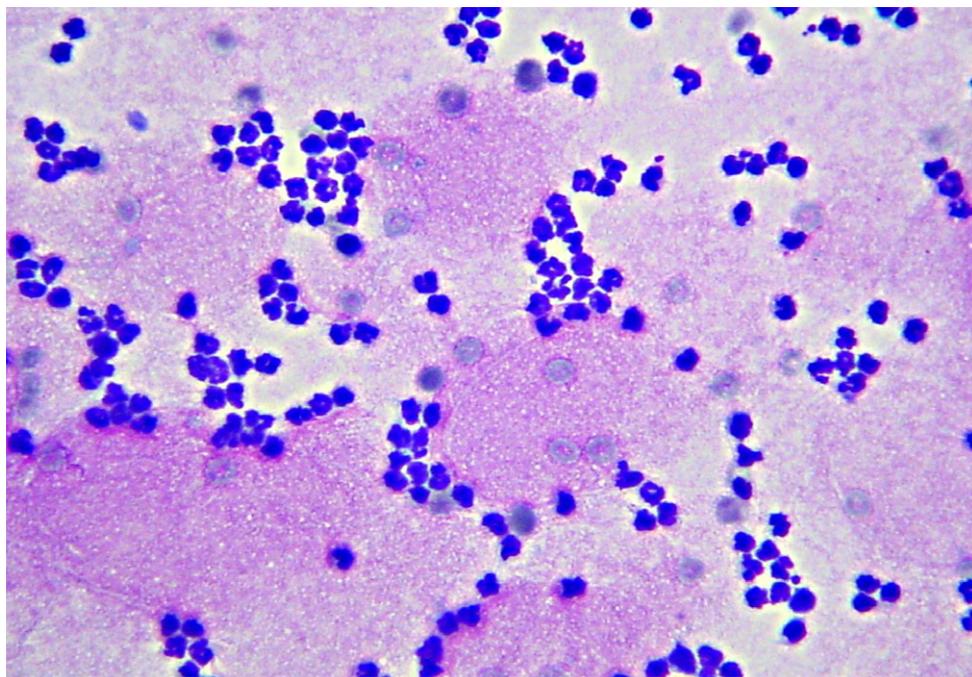
È importante effettuare questa procedura diagnostica in pazienti NON in terapia con farmaci anti-infiammatori (in particolare corticosteroidi), per evitare possibili falsi negativi.

A questo si deve aggiungere l'**esame batteriologico del liquido sinoviale**, utile per escludere forme batteriche, più rare e che difficilmente colpiscono più di una articolazione.

Per l'esame batteriologico del liquido sinoviale vi invitiamo a consultare questo nostro blog passato: <https://www.mylavblog.net/microbiologia/240-240.html>



Video: esempio di artrocentesi in cane con artrosinovite suppurativa. Si noti l'abbondanza del fluido raccolta, la ridotta viscosità e l'aspetto emorragico e torbido, tutte caratteristiche macroscopiche patologiche.



*Figura 2 – Esame citologico a basso ingrandimento di liquido sinoviale di cane con flogosi neutrofilica/suppurativa. In un liquido sinoviale normale, a questo ingrandimento, si osserverebbero solo pochi sinoviociti ed i neutrofilii rappresenterebbero meno del 5% delle cellule nucleate totali. In questo campione invece i neutrofilii, anche se coartati e non sempre ben riconoscibili, sono molto numerosi e rappresentano la quasi totalità delle cellule nucleate.*

Il protocollo diagnostico prevede inoltre:

- esami di laboratorio volti ad indagare la condizione clinica generale del paziente e identificare potenziali “trigger” della malattia.
- valutazione radiologica delle articolazioni, necessaria per stabilire se si tratta di una forma erosiva o non erosiva; deve inoltre essere mirata alla diagnosi di eventuali cause eziologiche, anche in questo caso come potenziali “trigger” (es.: neoplasie).

PROCEDURA DIAGNOSTICA	RISULTATO
Analisi del liquido sinoviale	> torbidità e < viscosità Essudato fibrinoso Neutrofili non degenerati Aumento dei sinoviociti Cellule LE (SLE) (evento molto raro) Aumento linfociti
Esame emocromocitometrico	Anemia (AID) Leucocitosi Trombocitopenia
Profilo chimico	Ipoalbuminemia Aumento CRP
Urine	Proteinuria
Ana test	Positivo se SLE
Radiografie degli arti	Effusione intra-articolare, tumefazione tessuti molli peri-articolari, erosione in alcuni casi
Istologia della sinovia	Infiltrazione di granulociti e mononucleati

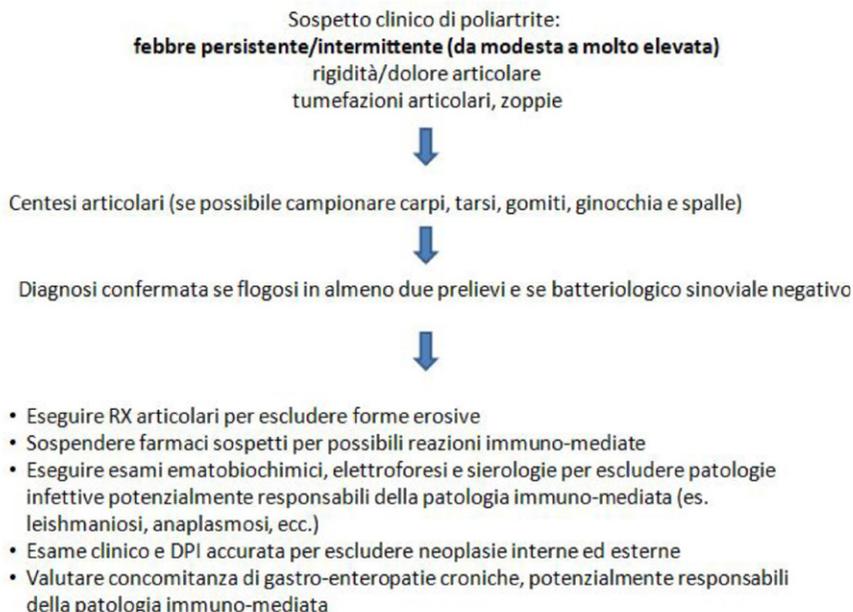
Tabella 1 – Elenco delle procedure diagnostiche utili in caso di poliartrite e possibili risultati.

Nel **gatto** le poliartriti sembrano essere decisamente più rare che nel cane; esiste tuttavia la possibilità che l'incidenza di questa patologia venga sottostimata. I felini infatti nascondono bene il dolore, e non è insolito che le uniche manifestazioni di poliartrite siano febbre e/o riluttanza al movimento, rendendo ancora più difficile la diagnosi.

Al contrario del cane, inoltre, le forme infettive sono più frequenti di quelle immuno-mediate, pertanto è sempre consigliato eseguire l'esame batteriologico del liquido sinoviale.

Infine, può essere utile ricordare l'associazione **Calicivirus-poliartrite**, possibile sia in corso di infezioni acute, sia come complicazione (transitoria ed autolimitante) della vaccinazione.

Per concludere vi mostriamo un algoritmo diagnostico semplificato e riassuntivo, degli step necessari per la diagnosi di poliartrite immuno-mediata. Nella prossima puntata vi daremo dei consigli per la gestione terapeutica di queste patologie.



**Francesco Dondi**, Università di Bologna e Esperto MYLAV per la medicina interna  
**Walter Bertazzolo**, EBVS European Specialist in Veterinary  
Clinical Pathology (Dipl. ECVCP); Direttore Scientifico di MYLAV

## **LA POLIARTRITE IMMUNO-MEDIATA COME FACCIO A TRATTARLA E MONITORARLA?**

Dopo avervi indicato gli step necessari per un corretto inquadramento diagnostico delle poliartriti immuno-mediate, vi diamo oggi alcuni consigli pratici sulla gestione terapeutica e sul monitoraggio clinico di queste patologie complesse.

Il trattamento delle poliartriti immuno-mediate prevede da un lato di ridurre dolore ed infiammazione e dall'altro di trattare le eventuali malattie sottostanti (se presenti e se si è riusciti a identificare un “trigger” scatenante).

A tal proposito, nelle zone in cui sono comuni le malattie trasmesse da zecche, non è scorretto impostare una terapia di tipo empirico con Doxiciclina a 10 mg/Kg PO SID o BID per 28 giorni, eventualmente in associazione ad analgesici quali FANS, tramadolo, oppioidi o altro a seconda del paziente che abbiamo di fronte (es.: nefropatico o meno). Nei cani in cui questa scelta risulti efficace, il miglioramento clinico avviene già nei primi 7 giorni e non necessita di immuno-soppressione.

Per le forme primarie idiopatiche, quelle causate da possibili trattamenti terapeutici/vaccinali e patologie che non si riescono a controllare/eliminare completamente (es. neoplasie) e quelle comunque persistenti indipendentemente dal “trigger” scatenante, sarà invece necessario ricorrere ad una terapia immunosoppressiva, ed è importante intraprenderla solo dopo aver ragionevolmente escluso una poliartrite infettiva, mediante esami microbiologici del liquido sinoviale e/o della membrana sinoviale.

I farmaci di prima linea per il trattamento delle poliartriti immuno-mediate sono i corticosteroidi (short term o long term), utilizzati a dosaggio immunosoppressivo, per indurre la remissione clinica e successivamente con dosaggio a scalare fino al raggiungimento della dose minima necessaria per mantenere la sintomatologia in remissione. Il trattamento deve avere una durata minima di 4 mesi, o ancor meglio, fino alla remissione completa della sintomatologia clinica, secondo lo schema in Figura 1.

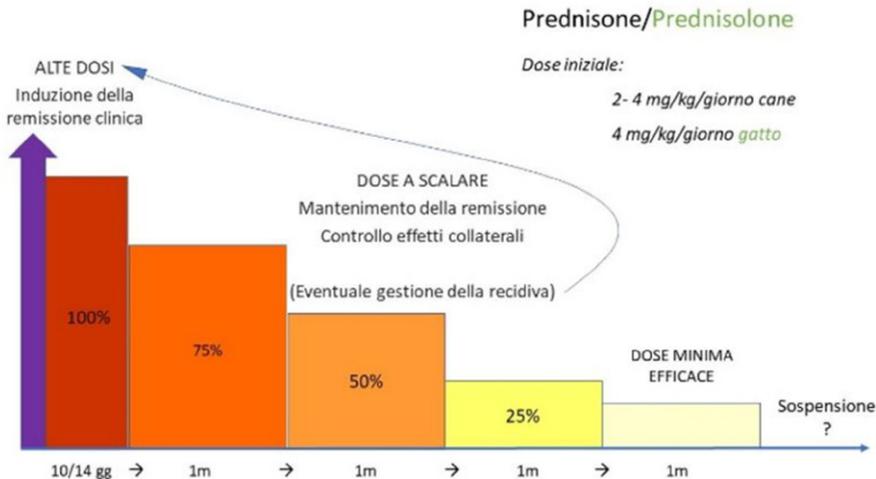


Figura 1 – Schema di trattamento immuno-soppressivo con cortisonici a scalare.

Si possono utilizzare ad esempio prednisone o prednisolone a 1-2 mg/kg PO BID, rivalutando il paziente dopo i primi 10-14 giorni e poi con cadenza mensile andando a ridurre (del 25 – 50%) il dosaggio di volta in volta, a fronte di un miglioramento clinico.

In caso di mancata risposta o recidiva, sarà invece necessario aumentare la dose di corticosteroidi o associare un immunosoppressore di seconda linea come ad esempio il micafenolato mofetile (MMF) 5-10 mg/kg PO BID, con l'obiettivo di scalare la dose di corticosteroidi del 50% ogni 2 settimane fino a sospenderli, e mantenere invariata quella di MMF per i primi 2 mesi. Dopo questo periodo, se il paziente risulta in remissione clinica, si potrà dimezzare il dosaggio del MMF per ulteriori 2 mesi per poi sospenderlo (Figura 2).

## Esempio associazione

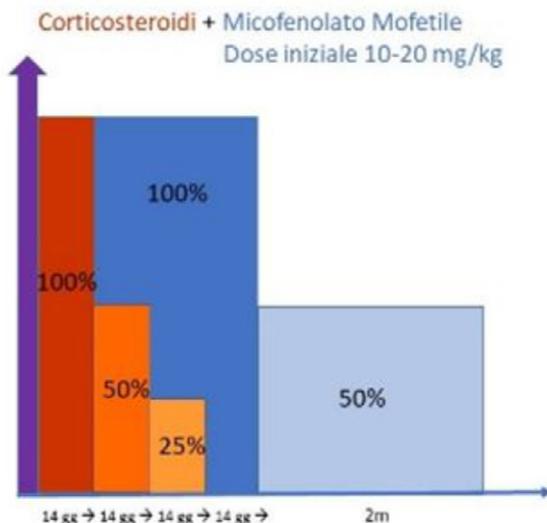


Figura 2 – Schema di combinazione di cortisonici e MMF.

Nel gatto è consigliato utilizzare altri corticosteroidi rispetto al prednisone, come prednisolone, metil-prednisolone ecc., eventualmente in associazione al cloram-bucile 4 mg/gatto da ripetere ogni 3 settimane o metà dose ogni 2/3 giorni.

Anche altri immunosoppressori (vedi Tabella 1) vengono riportati in letteratura come possibili alternative/associazioni ai corticosteroidi nel trattamento di questa patologia, tuttavia gli studi a riguardo ad oggi non sono molti e non è possibile stabilire se alcuni siano meglio di altri; l'efficacia sembra infatti variare molto nei singoli casi. Molti casi rispondono bene al solo utilizzo di corticosteroidi, mentre i casi più complessi o recidivanti richiedono una terapia combinata.

FARMACO	DOSE INIZIALE	EFFETTI COLLATERALI	COSTO prezzo/giorno per un cane di 20 kg:
<b>Prednisone</b> <b>Prednisolone</b>	2-4mg/kg/die	pu/pd, polifagia, tachipnea, proteinuria, sintomi GI, dermatopatia ...	1,5 €
<b>Micofenolato Mofetile</b>	10-20 mg/kg/die	vomito, diarrea, anoressia, dimagrimento, ↑ rischio infezione, neutropenia (mielosoppressione)	1 €
<b>Leflunomide</b>	2-4 mg/kg/die (per 1-6 settimane)	riduzione dell'appetito, vomito, letargia, linfopenia, anemia (mielosoppressione)	20 €
<b>Ciclosporina</b>	10 mg/kg/die	vomito, diarrea, anoressia e nausea, iperplasia gengivale e ipertricosi, ↑ rischio infezioni, lesioni cutanee	13 €
<b>Azatioprina</b>	2 mg/kg/die (per 3-4 sett, poi a giorni alterni)	vomito, diarrea, anoressia, epatopatia, pancreopatia, mielosoppressione	0.6 €
<b>Ciclofosfamide</b>	1,5-2,5 mg/Kg /4 giorni su 7)	mielosoppressione, cistite emorragica, sintomi GI, alopecia	0.4 €

*Tabella 1 – Opzioni terapeutiche per la terapia immuno-soppressiva delle poliartriti immuno-mediate.*

Per quanto riguarda il monitoraggio di questi pazienti, un primo controllo a distanza di circa 7 giorni dall'introduzione della terapia immunosoppressiva è utile per aggiustare la dose o associare un secondo farmaco, valutare la comparsa di possibili effetti collaterali e, a fronte di una mancata risposta, rivalutare la diagnosi iniziale.

Per il resto, i tempi del follow up vengono stabiliti caso per caso in base all'evoluzione dei segni clinici e delle alterazioni clinico-patologiche. A tal proposito, la ripetizione seriale delle artrocentesi non è particolarmente raccomandabile nella pratica clinica, in quanto troppo invasiva come procedura di controllo; è preferibile ripetere gli esami emato-biochimici includendo sempre la proteina C-reattiva, ottimo marker di attività infiammatoria della patologia. Il miglioramento clinico resta ad oggi il nostro obiettivo primario!

La prognosi è generalmente buona; nella maggior parte dei casi (90%) la risposta alla terapia steroidea o combinata è rapida e spesso il trattamento non deve essere continuato a vita.

Esiste purtroppo anche una percentuale minore di casi più complessi, che non rispondono alle terapie o recidivano frequentemente, continuando a manifestare



dolore cronico e nei quali si ha una progressiva degenerazione articolare. Inoltre, non è insolito che l'uso prolungato di corticosteroidi o altri immunosoppressori di seconda linea, causi effetti collaterali, ed è quindi importante provare a scalarne il dosaggio e conoscere le diverse opzioni terapeutiche.

Si ricorda infine che le forme erosive, fortunatamente più rare, sono più difficili da trattare essendo caratterizzate ormai da alterazioni anatomiche e funzionali permanenti e progressive dei tessuti articolari.

**Francesco Dondi**, Università di Bologna e Esperto MYLAV in medicina interna.  
**Walter Bertazzolo**, EBVS European Specialist in Veterinary Clinical Pathology  
(Dipl. ECVCP); Direttore Scientifico di MYLAV.



## **ALCUNE NOVITA' SU SDS-AGE NEL GATTO NEFROPATICO**

Che informazioni possono derivare dalla valutazione dell'escrezione delle proteine urinarie nei gatti nefropatici? Uno studio recentemente pubblicato sul Journal of Feline Medicine and Surgery ha indagato questi aspetti in due gruppi di gatti nefropatici e di controllo. Ve ne riassumiamo i risultati e le conclusioni in questo post.

In questo post di aggiornamento bibliografico vi parleremo di un recente studio pubblicato sul Journal of Feline Medicine and Surgery (Giraldi M, Paltrinieri S, Scarpa P. Electrophoretic patterns of proteinuria in feline spontaneous chronic kidney disease. 22(2):114-121; 2020).

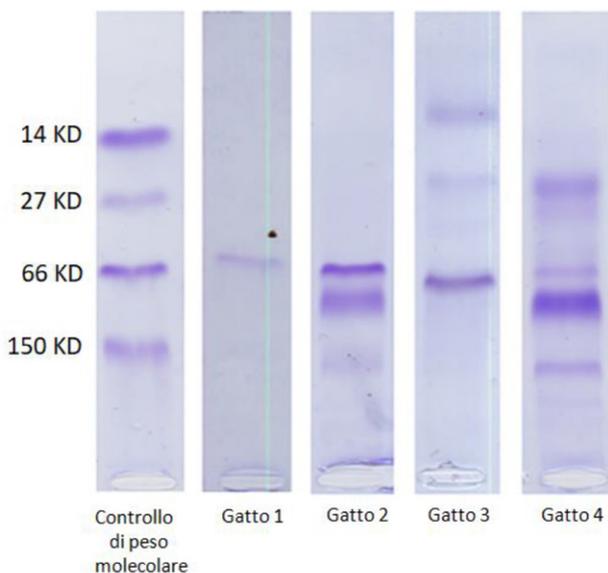
Lo studio ha come oggetto d'indagine l'analisi qualitativa della proteinuria nel gatto nefropatico cronico, eseguita attraverso l'elettroforesi su agar gel previo trattamento delle proteine urinarie con sodio dodecil solfato (SDS-AGE – sodium dodecyl-sulphate agar gel electrophoresis).

Allo stato attuale, sono poche le evidenze scientifiche descritte in letteratura riguardo i pattern elettroforetici urinari nel gatto nefropatico e, di riflesso, riguardo l'utilità di questa metodica nell'approccio diagnostico al paziente nefropatico felino. Gli autori dello studio si sono quindi posti l'obiettivo di descrivere i pattern elettroforetici urinari sia dei pazienti nefropatici sia dei soggetti a rischio di sviluppare la nefropatia cronica; inoltre è stata indagata la possibile associazione tra specifiche bande elettroforetiche e la nefropatia cronica.

Per questi scopi sono stati inclusi 70 campioni di urina raccolti da 22 gatti nefropatici a diversi stadi IRIS (44 campioni) e 17 gatti (26 campioni) a rischio di sviluppare nefropatia (ovvero gatti di età superiori a 8 anni o appartenenti a razze predisposte a nefropatia cronica).

I surnatanti dei campioni urinari sono stati quindi saggiati con la metodica SDS-AGE ed i tracciati così ottenuti sono stati valutati per la presenza, tipo di bande elettroforetiche e per il tipo di pattern (Figura 1).

Un primo risultato interessante è stato il riscontro di bande glomerulari (proteine con peso molecolare maggiore dell'albumina) nella maggior parte dei soggetti clinicamente sani e non proteinurici classificati come a rischio: 22 su 26 (84.6%) esami presentavano bande glomerulari (un esempio nella Figura 1, gatti 2 e 4)



Gli autori ipotizzavano che tali proteine potessero verosimilmente essere rappresentate da cauxina e uromodulina (due proteine fisiologicamente presenti nelle urine di gatto), oltre che da ridotte quantità di albumina. Questo risultato sottolinea che l'esame qualitativo della proteinuria, eseguito senza tenere conto del rapporto PU/CU e di una valutazione clinica del paziente, può essere poco utile se non fuorviante.

Un ulteriore importante risultato è stata l'associazione statisticamente significativa tra bande tubulari, ovvero con peso molecolare inferiore all'albumina (Figura 1, gatti 3 e 4), con la presenza di una nefropatia a tutti gli stadi IRIS: 18 su 44 campioni da gatti nefropatici presentavano bande tubulari a fronte di 1 caso nel gruppo dei 26 campioni da gatti a rischio.



Inoltre, 11 su 25 campioni da gatti con PU/CU >2 presentavano bande tubulari a fronte di 8 su 45 campioni da gatti con PU/CU <0.2, dimostrando una associazione significativa tra proteinuria clinicamente significativa e bande tubulari. La presenza di proteine ad alto peso molecolare non era invece associata né a nefropatia né a proteinuria quantitativamente significativa. Ciò ha permesso di concludere che nei pazienti inclusi nello studio, ma probabilmente anche nella maggior parte dei pazienti nefropatici sul campo, la proteinuria è di tipo tubulare, coerentemente con la natura prevalentemente tubulo-interstiziale del danno renale.

Infine, l'associazione tra bande tubulari e PU/CU >0.2 può essere di particolare interesse diagnostico, poiché ci suggerisce che evidenziare un pattern tubulare o misto in pazienti nefropatici con proteinuria borderline (PU/CU compreso tra 0.2 e 0.4) può supportare la diagnosi di proteinuria di origine renale.

Le attuali linee guida IRIS infatti suggeriscono di monitorare i pazienti con proteinuria borderline e di instaurare un trattamento per la proteinuria con PU/CU stabilmente >0.4 (dopo aver escluso le altre cause extrarenali di proteinuria).

Sono però sempre maggiori le evidenze scientifiche, inclusa questa descritta nell'articolo, che supportano l'ipotesi che anche i soggetti con proteinuria borderline debbano essere considerati patologici e che quindi debbano subire specifico trattamento.

Può essere utile pertanto eseguire l'esame SDS-AGE proprio in questi pazienti nefropatici con costante proteinuria borderline.

**Marco Girdali**, Med. Vet., PhD, Staff di MYLAV

**Walter Bertazzolo**, Med. Vet. EBVS European Specialist in Veterinary Clinical Pathology (Dipl. ECVCP); Direttore Scientifico di MYLAV.

## **LINFONODI INTRA-ADDOMINALI MEGALICI NEL GATTO: LA CITOLOGIA SPESSO NON BASTA**

Si tratta di un rilievo clinico ed ecografico molto comune in medicina felina: l'aumento di volume dei linfonodi viscerali intra-addominali. Viene regolarmente, e giustamente, approfondito in primo luogo attraverso una citologia per FNA.

I clinici ripongono molte aspettative in questa procedura diagnostica, ma nell'esperienza del citopatologo, queste aspettative spesso vengono deluse. Un recente studio ha avvalorato questa ridotta affidabilità della citologia in queste situazioni: cerchiamo di spiegarvi il perché.

Quante volte nella nostra pratica viene riscontrato un aumento di volume dei linfonodi viscerali addominali (es. mesenterici, ileo-colici, gastrici, pancreatico duodenali, iliaci mediali, ecc.) nel gatto? Si tratta spesso di pazienti felini con le più disparate presentazioni cliniche: anoressia, ittero, sintomi gastroenterici, dolore addominale, versamento cavitario, e così via.

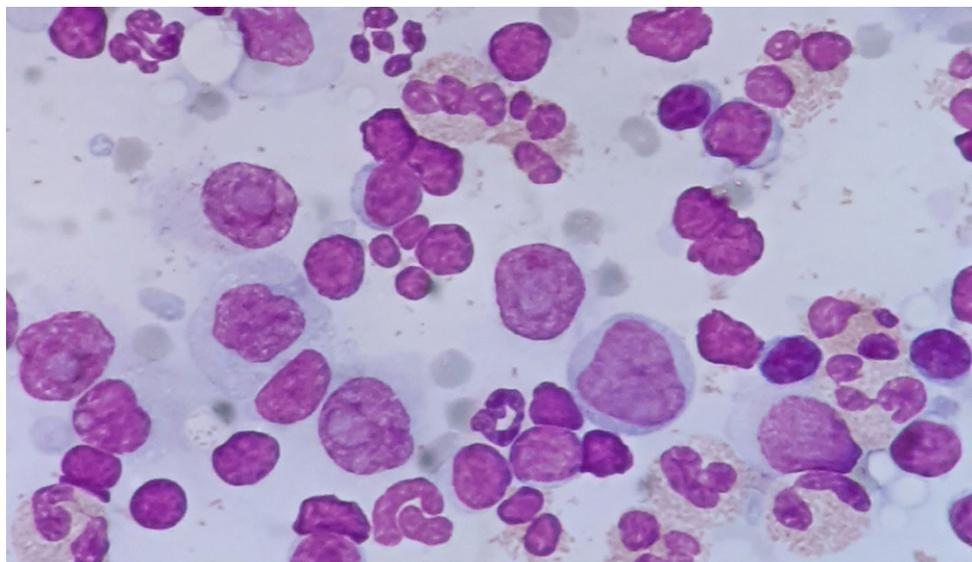
Talvolta questi linfonodi megalici sono associati ad altre anomalie dei visceri, identificabili all'esame ecografico. Giustamente, il primo step diagnostico che viene proposto al proprietario è proprio una citologia per FNA dei linfonodi megalici, nella speranza di poter individuare dei quadri citopatologici specifici di una particolare malattia e di poter escludere soprattutto una neoplasia (es. un linfoma).

Nell'esperienza del citopatologo medio (a cui io appartengo), purtroppo nella maggior parte dei casi si rilevano aspetti microscopici poco specifici (es. una linfadenopatia reattiva); se siamo più fortunati riusciamo ad individuare quadri più rari e un po' più indicativi (come una linfadenite piogranulomatosa in un sospetto di FIP, oppure un linfoma dei linfociti granulari o ad alto grado, o addirittura infezioni rare come le micobatteriosi o la criptococcosi).

La situazione più classica è la seguente: gatto con sintomi gastroenterici vaghi e con alterazioni ecografiche della parete gastrica e/o intestinale e con linfadenomegalia viscerale regionale. Siccome la parete del tubo gastroenterico è difficil-

mente (e spesso con scarsi risultati, a meno che non siano presenti evidenti masse) campionabile mediante FNA, il clinico opta per il campionamento citologico dei soli linfonodi. Ebbene in questi casi è molto difficile raggiungere una diagnosi certa, perché il quadro linfonodale spesso è aspecifico e non è detto che sia correlabile con la patologia primaria.

Un recente studio pubblicato sul Journal of Feline Medicine and Surgery (Correa & Demetriou “Retrospective assessment of the clinical relevance of surgical biopsies of abdominal lymph nodes in cats: 51 cases (2014-2018) ha confrontato i risultati della biopsia istologica linfonodale con quelli dell’esame citologico per FNA, in pazienti felini con vari tipi di patologie (infiammatorie e neoplastiche). Sebbene la specificità della citologia per una diagnosi di neoplasia fosse elevata (100%), la sua sensibilità è risultata inaccettabilmente bassa (solo il 20% nel rilevare metastasi regionali linfonodali di neoplasie intestinali).



*Figura 1 – linfadenite eosinofila mesenterica in un gatto. Questo rilievo citologico può purtroppo associarsi a diverse eziologie quali forme infiammatorie eosinofile/allergiche intestinali, sindrome iper-eosinofila e soprattutto linfoma T intestinale. Solo una biopsia linfonodale e degli altri visceri permette una diagnosi definitiva.*



I motivi di questa sensibilità così bassa possono essere molteplici: il linfonodo campionato può mostrare micro-metastasi all'esame istologico non rilevabili mediante FNA (limite dovuto al campionamento per FNA che può non essere rappresentativo di tutto il linfonodo). Inoltre, molti linfomi alimentari felini sono a basso grado e a piccole/medie cellule: senza una valutazione istologica dell'architettura linfonodale, è quasi impossibile identificare queste neoplasie con un FNA del linfonodo interessato.

Questo studio sottolinea quindi l'importanza di ottenere campioni istologici multipli (visceri interessati e linfonodi regionali) nei pazienti felini con linfadenomegalia addominale, e di non basarsi sulla sola citologia per indirizzare il problema verso una patologia infiammatoria VS neoplastica, ma di integrare tutti i dati clinici, citologici ed istologici con eventuali altre indagini avanzate (es. immuno-istochimica e PARR) nei casi dubbi.

**Walter Bertazzolo**, Med. Vet. EBVS European Specialist in Veterinary Clinical Pathology (Dipl. ECVCP); Direttore Scientifico di MYLAV.

## IMPORTANZA DELLA BATTERIURIA DA ENTEROCOCCUS SPP. NEL CANE

Gli Enterococchi sono comuni batteri del tratto gastroenterico e possono causare infezioni del tratto urinario. Queste infezioni sono tuttavia spesso secondarie ad urolitiasi e a problemi anatomici o neoplasie delle vie urinarie. Un recente studio ha studiato nei dettagli le infezioni urinarie da Enterococchi: ve ne riassumiamo i risultati.

I batteri appartenenti al genere *Enterococcus* fanno parte della normale flora del tratto gastroenterico dei mammiferi. In genere hanno bassa virulenza ma ampia possibilità di crescita in diversi distretti (bile, urine, sangue), il che li rende comunque potenzialmente patogeni.

In medicina veterinaria, *Enterococcus* spp. nel cane è dal quarto al quinto (in base ai diversi studi) genere di batterio più frequentemente isolato in caso di batteriuria. Di tutti i cani con batteriuria da *Enterococcus* spp., circa la metà mostrano effettivamente segni di UTI (“urinary tract infection”).

Uno studio recentemente pubblicato (Wood et al. Risk factors for enterococcal bacteriuria in dogs: a retrospective study. *J Vet Intern Med.* 2020) ha valutato i diversi fattori di rischio che nel cane predispongono alle infezioni del tratto urinario sostenute da *Enterococcus* spp.

Sono stati selezionati due gruppi di cani (lo studio è stato eseguito presso “University of Wisconsin-Madison Veterinary Teaching Ho-



Figura 1 – Colonie di *Enterococcus* spp. in cultura.



spital Microbiology Service”): il primo gruppo è rappresentato da 70 cani con infezione da *Enterococcus* spp. nelle vie urinarie e 70 cani, utilizzati come controllo, aventi infezione da *Escherichia coli* nelle vie urinarie. I gruppi sono stati scelti in modo da uniformare età e peso dell’animale.

Dallo studio retrospettivo si è evinto che il fattore di rischio più frequentemente associato a batteriuria da *Enterococcus* spp. è la presenza di anomalie anatomiche del tratto urinario, in minor misura invece risulta essere associata alle urolitiasi e alle neoplasie del tratto urinario. Le urine con batteriuria da *Enterococcus* spp. inoltre risultano essere maggiormente concentrate e poco associate alla presenza di piuria, se confrontate con quelle positive per *Escherichia coli*.

*Enterococcus faecalis* è la specie più frequentemente isolata (61%), seguita da *E. faecium*.

Nonostante questo studio non differenzi la batteriuria asintomatica dall’infezione del tratto urinario vera e propria, la combinazione tra potenziale patogeno e tendenza allo sviluppo dell’antibiotico resistenza, può creare un problema a lungo termine. La gestione ottimale di una batteriuria da *Enterococcus* spp., è pertanto volta a identificare e correggere, se possibile, quelle che sono le anomalie predisponenti sottostanti la colonizzazione batterica del tratto urinario.

**Marta Medardo**, Med. Vet. Responsabile del servizio di Microbiologia di MYLAV.

**Walter Bertazzolo**, Med. Vet. EBVS European Specialist in Veterinary Clinical Pathology (Dipl. ECVCP); Direttore Scientifico di MYLAV.

## LE MALATTIE INFETTIVE NEGLETTE DEL GATTO: LA LEPTOSIROSÌ

Con questo nuovo blog, iniziamo a proporvi una serie di aggiornamenti settimanali su alcune malattie infettive feline poco conosciute, sottostimate e spesso per nulla considerate da noi veterinari. Iniziamo col parlarvi della leptospirosi, che regolarmente associamo al cane o ad altri animali da reddito, ma che non consideriamo importante per il gatto.



I batteri del genere *Leptospira* sono numerosi ed includono sia specie patogene che non patogene. Diverse sierovarianti di *Leptospira* possono causare malattie nell'uomo e negli animali. In particolare la leptospirosi umana è una importante e frequente zoonosi. Conosciamo relativamente bene la patologia nel cane e le sue possibili presentazioni cliniche. Ma cosa sappiamo del gatto? I gatti possono infet-

tarsi? E possono ammalarsi ed essere un rischio zoonotico per l'uomo? Una recente review pubblicata sul Journal of Feline Medicine and Surgery (Murillo et al, JFMS 22: 216-228; 2020) ha approfondito questo argomento poco conosciuto tra i veterinari.

Tutti i mammiferi possono infettarsi con le leptospire. Le diverse specie animali possono fungere da "reservoir" per specifiche siero-varianti (ad es. il cane per *L. canicola*, il topo per *L. icterohaemorrhagiae*): questi serbatoi naturali fungono anche da disseminatori del batterio nell'ambiente e quindi potenziali fonti di contagio per gli altri animali. L'infezione avviene infatti quasi sempre mediante il contatto di cute e mucose con materiale infetto (spesso acqua contaminata ed urina). Questi serbatoi e diffusori sono solitamente animali che si infettano da giovani e che sviluppano una patologia sub-clinica, mentre quelli che si ammalano seriamente sono spesso infetti con siero-varianti a cui non si sono adattati.

I gatti si possono infettare con diverse siero varianti (in particolare Pomona, Griptophosa, Australis, Canicola, ecc.). La siero-prevalenza nella popolazione felina varia dal 4 al 33% in diversi studi condotti in aree geografiche differenti del mondo. La principale fonte di infezione per i gatti, è il consumo di prede infette o di materiale infetto di allevamenti (es. bovini e suini).

I gatti possono quindi a loro volta diventare reservoir dell'infezione e diventare un potenziale rischio per l'uomo e gli altri animali, in quanto diventano eliminatori di batteri con le urine.

La patogenesi è probabilmente sovrapponibile a quella di altre specie: dopo l'ingresso le leptospire determinano prima batteriemia nella fase acuta (circa 1 settimana post-infezione) per poi distribuirsi in vari organi. Nei tubuli renali possono persistere per settimane o mesi, causando una escrezione urinaria persistente. Sebbene i dati nel gatto siano molto scarsi, le principali azioni patologiche delle leptospire sono riconducibili ad un danno renale, con possibile sviluppo di insufficienza renale acuta o cronica, e lesioni epatiche necrotiche ed infiammatorie.

I **segni clinici** possono essere molto variabili, poco specifici e potenzialmente attribuibili a molte altre patologie: sono descritti **PU/PD**, segni **gastroenterici**, **versamenti cavitari**, **uveite**, **dolori diffusi**, **zoppie** e anche **lesioni cutanee**.



Quanti di noi sospetterebbero la leptospirosi in gatti con questi sintomi e segni clinici?

Il fatto che non diagnostichiamo mai la leptospirosi nel gatto, dipende principalmente dal fatto che non la cerchiamo mai, visto che la consideriamo una patologia tipicamente del cane mentre siamo sempre stati propensi a pensare che i gatti siano naturalmente resistenti all'infezione. Anche da un punto di vista delle alterazioni di laboratorio, i rilievi possono essere scarsi, poco specifici e perlopiù riferibili ad alterazioni infiammatorie acute o croniche e ad una patologia renale, con lo sviluppo di azotemia, riduzione del PS urinario e glicosuria.

Per la conferma diagnostica, valgono le stesse procedure utilizzate per il cane: ricordiamo infatti che le leptospire non possono essere visualizzabili nelle urine con la microscopia del sedimento. È necessario pertanto ricorrere all'identificazione mediante PCR su sangue (in fase acuta) e nelle urine stesse.

Ricordiamo anche che il risultato è fortemente influenzato da eventuali trattamenti antibiotici già iniziati, in quanto questi tendono a far scomparire rapidamente i batteri nel sangue e nelle urine. La sierologia mediante MAT, eseguita nei centri di riferimento per la leptospirosi, è un altro metodo valido come per il cane. Si ritiene tuttavia che le sieropositività nei gatti siano più basse rispetto al cane, ma nei gatti c'è il vantaggio di non avere il fattore confondente degli anticorpi di derivazione vaccinale.

Il trattamento dell'infezione è simile a quanto viene descritto per la controparte canina, con fluido terapia di sostegno ed antibiotico-terapia (ampicillina prima e tetracicline successivamente, per ridurre il rischio di escrezione urinaria cronica) quali cardini necessari nelle fasi acute della patologia.

Alcuni pazienti possono tuttavia evolvere ad una patologia renale cronica. A tale proposito non è chiaro il possibile ruolo ed incidenza di questa infezione nello sviluppo delle comuni nefriti interstiziali croniche del gatto, sebbene uno studio abbia dimostrato una maggiore prevalenza di sieropositività nei gatti con malattia renale cronica rispetto al gruppo di controllo (Rodriguez et al 2014; JVIM 28: 284-293).



Si ricorda che tale patologia è una **zoonosi**: le urine degli animali infetti (asintomatici e non) sono una fonte di infezione per gli altri animali e le persone, per cui in caso di positività alla PCR, è necessario adottare misure preventive per evitare il contatto con le escrezioni.

Questo rischio è fortemente sottovalutato: un recentissimo studio condotto in sud America (Dorsch et al, 2020; PLoS One 15(10): 1-17) su un gruppo di gatti con accesso all'esterno, ha infatti mostrato una elevata percentuale di soggetti (circa 16%) con escrezione urinaria di leptospire (PCR e/o coltura positive).

Tutte queste recenti informazioni dovrebbero farci riflettere e iniziare a considerare questa infezione potenzialmente rilevante anche per il gatto.

**Walter Bertazzolo**, Med. Vet. EBVS European Specialist in Veterinary Clinical Pathology (Dipl. ECVCP); Direttore Scientifico di MYLAV.

## UN NUOVO MARKER DI DANNO RENALE: LA MISURAZIONE DEL NGAL NELLE URINE

L'NGAL è un promettente biomarker di danno renale acuto nel cane. Vediamo a cosa serve e dove possiamo dosarlo.

La diagnosi di insufficienza renale acuta o meglio di danno renale acuto (AKI) è basata su diversi rilievi clinici e di laboratorio:

- Gli animali spesso sono in buono stato di salute generale, a testimonianza di una evoluzione molto rapida della patologia, al contrario dei pazienti cronici
- Non è solitamente presente anemia (tipica invece delle forme croniche)
- La produzione urinaria è molto bassa se non virtualmente assente (oliguria o anuria; il cosiddetto “blocco renale”)
- Vi è un repentino aumento di azotemia e creatinina
- Vi è una eccessiva perdita di alcuni componenti normalmente presenti nelle urine (es. glucosio, elettroliti, proteine)
- Vi è lo sviluppo di anomalie emogas-analitiche nel sangue (es. lo sviluppo di acidosi metabolica)
- Sono presenti alterazioni ecografiche renali compatibili e non riconducibili ad una patologia renale cronica

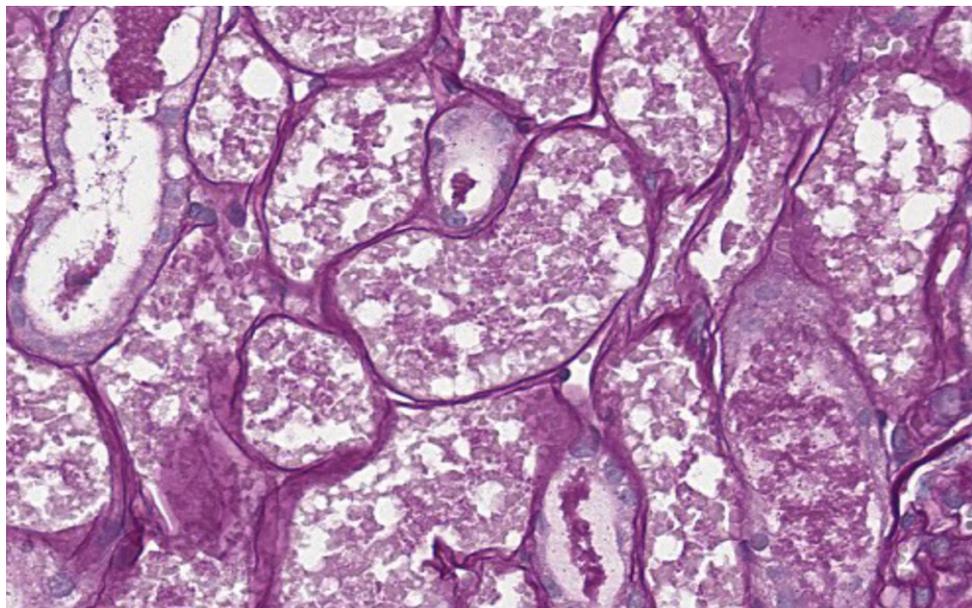
La diagnosi precoce di AKI può non essere così semplice: nelle fasi precoci l'aumento di azotemia e creatinina può essere solo modesto o assente. Inoltre non avendo a disposizione i valori basali normali di creatinina del paziente, non è sempre agevole rilevare delle minime variazioni dal suo livello fisiologico.

Un valore di creatinina di 1,6 mg/dL potrebbe apparire poco significativo in un cane che non sta molto bene: ma se lo stesso paziente avesse avuto il giorno precedente un valore basale fisiologico di 1,0 mg/dL, questo improvviso incremento potrebbe essere già indicativo di danno renale e nascondere presumibilmente un rapido decremento della velocità di filtrazione glomerulare (VFG).

Tale condizione potrebbe essere responsiva al trattamento con fluido-terapia (“Volume responsive Akute Kidney Injury; VR-AKI”; cosiddette forme pre-renali), oppure essere realmente legata ad un danno renale a carico dei nefroni (“Intrinsic AKI; I-AKI”; cosiddetto danno renale intrinseco).

Da decenni si studiano potenziali marker plasmatici ed urinari in grado di individuare precocemente (ovvero prima che aumentino creatinina e urea) il danno renale acuto: l'utilizzo di tali biomarker faciliterebbe il riconoscimento precoce di un AKI e quindi promuoverebbe una terapia più aggressiva e mirata, fin dalle prime fasi della malattia.

Uno dei biomarker più promettenti, utilizzato da qualche anno in medicina umana e recentemente investigato anche in medicina veterinaria è l'NGAL (“Neutrophil gelatinase-associated lipocalin”), una molecola di 25 kD prodotta da neutrofili e cellule epiteliali e coinvolta nella protezione naturale contro le infezioni batteriche



*Figura 1 – Necrosi tubulare renale in un esame istologico di cane. (Per gentile concessione del Prof. Luca Aresu, Università di Torino).*

(ha il ruolo di impedire l'utilizzo del ferro da parte dei batteri, limitandone la loro crescita e la potenziale diffusione nei siti di infezione).

L'NGAL prodotto nei vari tessuti viene eliminato per via renale, ma viene anche riassorbito dalle cellule epiteliali dei tubuli renali: un danno a carico di queste cellule può pertanto aumentare l'escrezione urinaria della molecola. Le cellule epiteliali tubulari renali producono, inoltre, grandi quantità di NGAL, soprattutto durante un evento dannoso a carico dei nefroni (di natura ischemia, tossica o infiammatoria). L'effetto finale è un aumento dell'escrezione urinaria di NGAL in queste situazioni patologiche: questo aumento repentino può precedere l'instaurarsi delle altre classiche alterazioni riconducibili alla classica insufficienza renale acuta.

Recenti studi hanno dimostrato come in corso di AKI, sia nelle forme di VR-AKI che in quelle di I-AKI, l'escrezione urinaria di NGAL sia molto aumentata rispetto ai soggetti sani.

Un'altra causa di aumento sono i processi infiammatori sistemici, sia per l'aumentata produzione sistemica di NGAL, che per l'eventuale effetto sull'integrità renale. Non sembra che l'aumento di NGAL sia correlabile alla prognosi dell'AKI ed al tipo di patogenesi. In uno studio recente, ad esempio, animali con AKI da leptospirosi avevano concentrazioni di NGAL molto elevate, ma non differenti rispetto a quelle di cani affetti da AKI con cause differenti.

Ricordiamo infine che a differenza dell'SDMA e della creatinina, che sono correlati con la VFG, l'NGAL è un puro marker di flogosi e di danno anatomico/cellulare a carico dei tessuti renali (in particolare dei tubuli).

L'NGAL è finora stato un biomarker utilizzato più che altro in ambito di ricerca e tossicologico, ma dal 2021 saremo in grado di fornire la determinazione di NGAL urinario (sia come valore assoluto, che come concentrazione normalizzata alla creatinina), misurato mediante tecnologia ELISA, ai clienti del laboratorio Mylav che ne volessero sfruttare il suo potenziale diagnostico promettente.

**Francesco Dondi**, Università di Bologna, Esperto MYLAV  
per Medicina Interna e Nefrologia

**Walter Bertazzolo**, Med. Vet. EBVS European Specialist in Veterinary Clinical  
Pathology (Dipl. ECVCP); Direttore Scientifico di MYLAV

## LA SAA NEL CANE

La siero-amiloide A (SAA) è una proteina di fase acuta comunemente utilizzata nel gatto per monitorare gli stati infiammatori. Nel cane invece siamo tutti abituati ad utilizzare più comunemente la proteina C-reattiva (CRP).

Ma la SAA può essere utile anche nel cane? E che vantaggi può comportare rispetto alla CRP?

Le proteine di fase acuta (“Acute phase proteins” – APP) sono un gruppo di molecole sintetizzate dal fegato, la cui produzione aumenta o diminuisce a seguito di stimoli infiammatori di varia natura: quando in un sito di flogosi vengono prodotte citochine infiammatorie da parte dei leucociti (in particolare granulociti neutrofili, eosinofili e macrofagi).

Questi mediatori agiscono sugli epatociti, facendo aumentare la sintesi di alcune APP (definite per l'appunto APP POSITIVE, ad es. SAA, CRP, Aptoglobina, Fibrinogeno) e facendo diminuire quella di altre (APP NEGATIVE, ad es. Albumina, Transferrina). Sebbene alcune di queste alterazioni biochimiche non abbiano una chiara spiegazione fisiopatologica, si ritiene che si tratti di un adattamento naturale dell'organismo a potenziali agenti patogeni (es. microrganismi) (Figura 1).

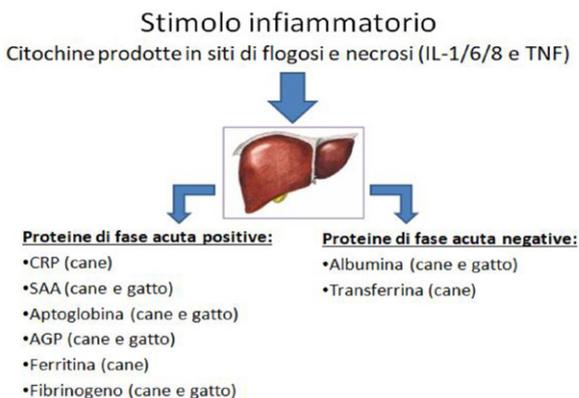


Figura 1 – Esempio schematico della fisiologia alla base della produzione delle APP.

Ogni specie animale ha APP principali (ovvero quelle che si modificano maggiormente) ed altre minori. Ad esempio nel cane la CRP è una APP maggiore mentre per il gatto lo è la SAA.

Ma torniamo alla domanda iniziale, la SAA può essere dosata ed utilizzata anche nel cane?

La prima risposta è sì, può essere misurata, con un sistema sovrapponibile a quello utilizzato routinariamente anche nel gatto (immunoturbidimetria). Per quanto riguarda la sua possibile applicazione pratica, gli studi disponibili in letteratura sono molto inferiori alla CRP, ma viene evidenziato come:

La SAA in uno studio (Christensen et al 2014) era superiore alla CRP nel discriminare tra forme infiammatorie e non.

La SAA aumenta di più nelle patologie complicate da sepsi (ad esempio in una piometra complicata da sepsi rispetto ad una non complicata) (Jetpean et al 2014).

Da gennaio 2021 abbiamo pertanto deciso di mettere a disposizione ed a listino questo biomarker infiammatorio anche nel cane. Per chi volesse approfondire l'argomento, vi invitiamo alla lettura degli studi sotto indicati.

## **Bibliografia**

Christensen et al (2013) Canine serum amyloid A (SAA) measured by automated latex agglutination turbidimetry is useful for routine sensitive and specific detection of systemic inflammation in a general clinical setting. *J Vet Med Sci* 75(4):459-66. doi: 10.1292/jvms.12-0404.

Jetpean et al (2014) Increased concentrations of Serum amyloid A in dogs with sepsis caused by pyometra. *BMC Vet Res* 28;10:273. doi: 10.1186/s12917-014-0273-9.

Christensen et al (2014) Comparison of serum amyloid A and C-reactive protein as diagnostic markers of systemic inflammation in dogs. *Canadian Vet J* 55(2): 161-168.

**Walter Bertazzolo**, Med. Vet. EBVS European Specialist in Veterinary Clinical Pathology (Dipl. ECVCP); Direttore Scientifico di MYLAV.

## COME E QUANDO DOSARE IL RAME NEL FEGATO?

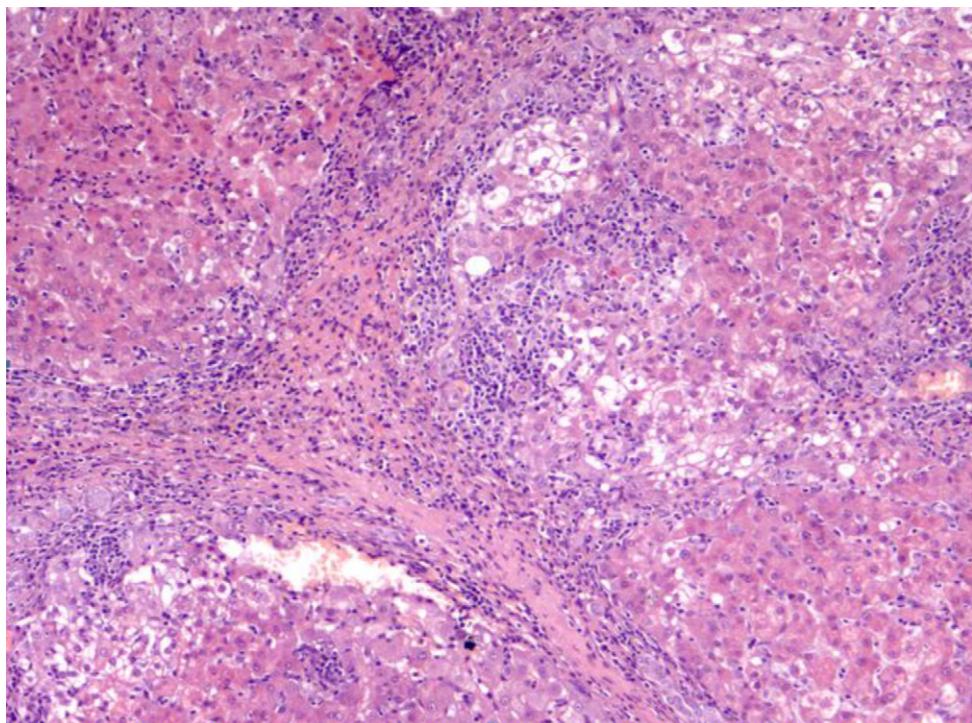
Alcune epatopatie canine sono caratterizzate da un accumulo patologico di rame negli epatociti: ci sono quindi degli step diagnostici fondamentali da eseguire per poterle diagnosticare correttamente. Ecco quali sono e come poterlo fare.

Il rame è un oligo-elemento essenziale (co-fattore per molti enzimi) ed il fegato svolge un ruolo fondamentale nel mantenimento della sua omeostasi. Un suo accumulo patologico si può verificare per un difetto metabolico primario, oppure secondariamente ad una alterata funzionalità epatica, con conseguente colestasi e alterata escrezione biliare, oppure per un eccesso dietetico.

Il rame in eccesso a livello cellulare induce uno stress ossidativo, conseguente degenerazione, morte cellulare ed infiammazione. Ne consegue quindi una epatite cronica. L'epatite cronica primaria è una condizione patologica centrata sugli spazi portali ed è caratterizzata da una flogosi linfo-plasmacellulare o variabilmente neutrofila e macrofagica, con occasionale infiltrazione del parenchima periportale (epatite da interfaccia), associata a necrosi/apoptosi epatocitaria, proliferazione dutturale e fibrosi (Figura 1). Numerose razze sono predisposte a tossicosi da rame tra le quali si annoverano: Bedlington Terrier, Doberman Pinschers, Labrador, Dalmata, Cocker Spaniel Inglese ed Americano, Springer Spaniel Inglese, West Highland White Terrier, Scottish Terrier, Cairn Terrier, Alano, Samoiedo, Yorkshire Terrier e Jack Russell Terrier.

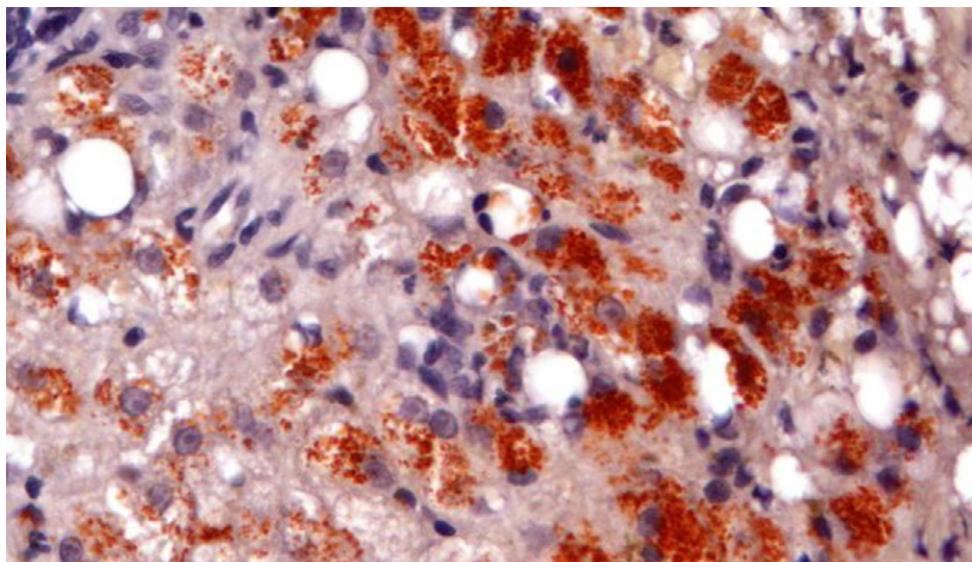
Secondo le linee guida ACVIM, la concentrazione di rame deve necessariamente essere valutata in tutti i casi di epatite cronica primaria. Fanno eccezione i casi di epatite cronica reattiva non specifica, in cui la causa dell'infiammazione non è una condizione epatica primaria, ma è conseguente a stimolazioni infiammatorie sistemiche (citochine dalla circolazione splancnica), in cui il fegato viene coinvolto secondariamente. L'epatite reattiva non specifica è caratterizzata istologicamente da infiammazione lieve o moderata, ma sono assenti la necrosi/apoptosi epatocellulare, fibrosi e rimodellamento architetturale.

Dato che potrebbe essere molto importante individuare una tendenza all'accumulo di rame negli epatociti, come possiamo confermarlo? Abbiamo due possibilità, entrambe necessarie e coadiuvanti.



*Figura 1 – Epatite cronica da interfaccia con marcata flogosi linfoplasmacellulare e neutrofilica, necrosi/apoptosi epatocellulare, fibrosi a ponte e proliferazione duttale (Ematossilina ed eosina).*

Il primo step avviene mediante la colorazione istochimica Rodanina, eseguibile su campioni di tessuto epatico fissati in formalina. La Rodanina, per affinità tintoriale, permette di stimare grossolanamente la quantità di rame all'interno degli epatociti (Figura 2); ci fornisce inoltre informazioni sulla sua distribuzione "spaziale", ovvero la sua localizzazione nel lobulo epatico. Nei disordini genetici primari (come nel caso del Bedlington Terrier che ha una deficienza genetica della proteina COMMD1), la localizzazione è primariamente centro-lobulare, con estensione nelle altre porzioni del lobulo man mano che la malattia progredisce. Per contro, un pattern peri-portale è associato ad un accumulo secondario, da colestasi o accumulo dietetico.



*Figura 2 – Colorazione istochimica Rodanina: accumulo patologico di rame score 4. Presenti ampi gruppi di epatociti peri-portali positivi con colorazione granulare citoplasmatica rosso-arancio intenso.*

Lo “scoring” dell’accumulo di rame avviene mediante un sistema di valutazione visiva che lo classifica in maniera “semi-quantitativa”, assegnando un punteggio che va da 0 a 5, in base alla sua estensione e distribuzione nel lobulo. Un punteggio superiore a 2 viene considerato patologico.

Il secondo step nella diagnosi: il dosaggio quantitativo del rame nel tessuto epatico.

La colorazione istochimica, sebbene garantisca un primo screening iniziale e fornisca informazioni sulla patogenesi della malattia (primaria o secondaria), deve essere accompagnata da un dosaggio quantitativo dell’elemento, mediante spettrofotometria ad assorbimento atomico, che è possibile richiedere nel 2021 nel nostro laboratorio.

I campioni da mandare per questo tipo di esame devono essere biopsie fresche e sono necessari circa 20-40 mg di fegato, equivalenti ad 1 biopsia di 2 cm con 14 G o metà di un campione laparoscopico da 5 mm. Facendo più prelievi biotici sarà possibile richiedere sia la valutazione istologica e istochimica (pezzi da fissare in

formalina), che il dosaggio del rame (il frammento bioptico dovrà essere mantenuto refrigerato/congelato fino all'invio al laboratorio).

La quantificazione del rame è il metodo più accurato ed è considerato il “gold standard” secondo l'ACVIM.

Nel cane, si considerino le seguenti linee guida (adattate da Cullen & Stalker 2016; Strickland et al 2018; Webster et al 2019); si tenga conto tuttavia che esiste una notevole variabilità di razza e che negli ultimi decenni si è assistito ad un incremento delle concentrazioni di rame epatico, probabilmente a causa di cambiamenti ambientali e/o dietetici.

- a) i cani sani hanno concentrazioni di rame epatico  $<400 \mu\text{g/g}$  di sostanza secca
- b) valori di rame tra  $600\text{-}1000 \mu\text{g/g}$  di sostanza secca sono considerati a rischio per lo sviluppo di epatite cronica
- c) valori di rame  $>1000 \mu\text{g/g}$  di sostanza secca sono considerati fortemente predisponenti lo sviluppo di epatite cronica
- d) valori di rame  $>1500\text{-}2000 \mu\text{g/g}$  di sostanza secca sono invariabilmente associati allo sviluppo di epatite cronica

#### **Bibliografia:**

Cullen and Stalker. Liver and Biliary System. In: Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals, 6th Edit., Vol. 2, MG Maxie, Ed., Elsevier, St. Louis, 2016.

Hoffmann G. Copper-associated liver diseases. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 2009 May;39(3):489-511.

Webster et al. ACVIM consensus statement on the diagnosis and treatment of chronic hepatitis in dogs. J Vet Intern Med. 2019 May;33(3):1173-1200.

Strickland JM et al: J Vet Intern Med. 2018;32:1943-1950

**Luisa Vera Muscatello**, Med. Vet., EBVS European Specialist in Veterinary Pathology (Dipl. ECVP), Università di Bologna e team dei patologi di MYLAV.  
**Walter Bertazzolo**, Med. Vet. EBVS European Specialist in Veterinary Clinical Pathology (Dipl. ECVCP); Direttore Scientifico di MYLAV.

## **A COSA SERVE LA MISURAZIONE DEGLI ANTICORPI ANTI-GANGLIOSIDI NEGLI UCCELLI?**

La Proventricular dilatation disease (PDD) definita recentemente Avian Ganglioneuritis (AG), è una patologia comune in molte specie di pappagalli e di altri uccelli.

È stata riscontrata per la prima volta nei pappagalli “ara” negli anni settanta del secolo scorso. Gli animali colpiti risultano positivi al Bornavirus aviare, che determina un deperimento progressivo e causa la morte del pappagallo.



La sintomatologia clinica si manifesta solo in pochi soggetti; la maggior parte degli animali positivi resta infatti asintomatica.

## **Quali specie sono colpite?**

La AG è stata documentata in pappagalli e uccelli di altre specie, sia selvatici che allevati in cattività, tra cui tucani, canarini, verdoni, oche canadesi e falchi pellegrini. Sono interessate più di ottanta specie di pappagalli, principalmente di taglia grande come cenerini, ara, amazzoni e cacatua. Tuttavia, il virus è stato isolato anche in pappagalli più piccoli quali parrocchetti monaci e inseparabili.

## **Quali sono le manifestazioni cliniche della malattia?**

Le principali manifestazioni cliniche sono anoressia, emaciazione, presenza di materiale indigerito nelle feci, dilatazione del gozzo e diminuzione del “body condition score” (BCS). Gli animali colpiti presentano atrofia dei muscoli pettorali e alla visita clinica è possibile valutare il tipico aspetto del petto “a lama di coltello”.

L’infezione causa dilatazione del proventricolo, distensione duodenale e ridotto transito dell’alimento. In rari casi è stata descritta la presenza di miocardite con lesioni a livello del cuore destro con morte improvvisa anche in pazienti apparentemente sani (Rossi et al. 2018).

## **In che modo si deve procedere per arrivare ad una diagnosi?**

Sono disponibili diversi test, ma la metodica più attendibile sembra essere la ricerca degli anticorpi anti-gangliosidi, da effettuare nei pazienti che manifestano sintomi neurologici e/o gastroenterici.

L’iter diagnostico potrebbe essere completato dalla biopsia del gozzo, che risulta essere diagnostica nel 35% dei pazienti (Berhane et al. 2001; Kistler et al. 2010), e dalla ricerca virale mediante PCR effettuata da tampone cloacale.

L’eliminazione del virus tuttavia è intermittente e la ricerca con PCR potrebbe non individuarne la presenza (Heffelsat al. 2012; Piepenbring et al. 2012). L’iter diagno-

stico deve essere completato da un esame emato-biochimico completo e dallo studio radiografico della cavità celomatica per evidenziare la dilatazione del proventricolo. Nei Lori la dilatazione del proventricolo, ventricolo e duodeno è spesso assente (Doneley et al. 2007).

### **Cosa serve per effettuare il test?**

Il test si esegue su quantità minime di siero o plasma di Psittaciformi; il quantitativo minimo richiesto è di 50 microlitri.

Dal 2021 saremo in grado di fornire questo test tra gli esami dedicati alle specie aviarie.

### **Bibliografia**

Berhane Y, Smith D, Newman S, et al. Peripheral neuritis in psittacine birds with proventricular dilatation disease. *Avian Pathol* 2001; 30:563–70. 33.

Doneley RJT, Miller RI, Fanning TE. Proventricular dilatation disease: an emerging exotic disease of parrots in Australia. *Aust Vet J* 2007; 85:119–23.

Kistler AL, Gancz A, Clubb S, et al. Recovery of divergent avian bornaviruses from cases of proventricular dilatation disease: identification of a candidate etiologic agent. *Virology* 2008; 5:88.

Heffels-Redmann U, Enderlein D, Herzog S, et al. Follow-up investigations on different courses of natural avian bornavirus infections in Psittacines. *Avian Dis* 2012; 56:153–9.

Piepenbring AK, Enderlein D, Herzog S, et al. Pathogenesis of avian bornavirus in experimentally infected cockatiels. *Emerg Infect Dis* 2012; 18:234–41.

Rossi G., Dahlhausen R., Galosi L., Orosz S.E., *Avian Ganglioneuritis in Clinical Practice*. *Vet Clin Exotic Anim* 2018; 21 Elsevier Inc.

Ardizzone F.: <https://allevamentodottssaardizzone.com/pdd-proventricolite-dilatativa-nei-pappagalli-indagini-diagnostiche-associate-e-gestione-della-patologia/>

**Gustavo Picci**, Esperto MYLAV per gli animali non convenzionali.

## LE MALATTIE INFETTIVE NEGLETTE DEL GATTO: LA FILARIOSI

In questo secondo capitolo sulle patologie infettive/infestive neglette del gatto, parliamo delle filariosi, intendendo sia le infestazioni cardiopolmonari causate da *Dirofilaria immitis* che quelle sottocutanee causate da *Dirofilaria (Noctiella) repens*. Prendiamo spunto da una recente review pubblicata sul *Journal of Feline Medicine and Surgery* (Pennisi et al., *JFMS* (2020) 22: 442-451), per darvi alcuni input su queste patologie ampiamente diffuse anche nel nostro territorio nazionale.

Le caratteristiche eziopatogenetiche e parassitologiche della filariosi cardiopolmonare felina non differiscono da quella canina. Tuttavia mentre il cane rappresenta l'ospite di elezione e sviluppa comunemente microfilaritemia, necessaria per la trasmissione della parassitosi con i vettori, **i gatti invece rappresentano un ospite accidentale/imperfetto** e di solito non hanno microfilaritemia rilevante.

Solo una piccola percentuale di L3 inoculate dai vettori possono infatti raggiungere lo stadio adulto, in tempo pressoché doppio rispetto a quello nel cane (7-9 mesi contro i 4-6 mesi); inoltre le dimensioni dei parassiti adulti nel gatto sono inferiori e raramente si riproducono, in quanto difficilmente si possono avere infestazioni con un numero di maschi e femmine sufficienti. I vermi adulti nel gatto infine vivono meno a lungo rispetto a quelli che parassitano i cani.

La diffusione delle filariosi feline è sovrapponibile a quella canina, essendo legata al medesimo tipo di trasmissione. Tuttavia, sebbene la forma cardiopolmonare nel cane si sia ridotta in termini di incidenza, grazie alle sempre più diffuse attività profilattiche, si è invece assistito ad una subdola diffusione della meno seria forma sottocutanea causata da *N. repens*.

L'aumento globale delle temperature e l'istaurarsi di inverni sempre più miti, hanno inoltre favorito la diffusione dei vettori (zanzare dei generi *Aedes* e *Culex* in particolare), anche in paesi prima poco interessati dal problema (es. il Regno Unito ed i paesi del Nord Europa). A causa della difficoltà di ottenere una conferma diagnostica definitiva (vedi oltre), è impossibile stabilire l'entità reale della diffusione di queste parassitosi nei felini domestici.

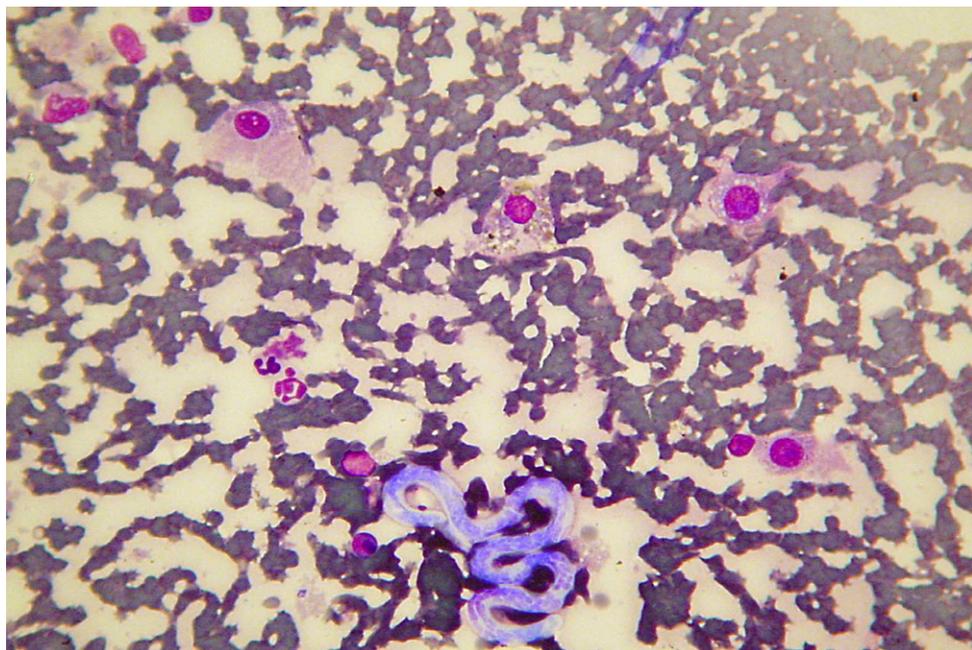
La patogenesi delle lesioni arteriose e polmonari indotte dalla filariosi cardiopolmonare felina è simile a quella del cane; le lesioni possono essere secondarie alla infestazione cronica, ma anche alla morte dei parassiti adulti, con rilascio di frammenti di parassita e di batteri endo-simbionti (*Wolbachia* spp.), in grado di scatenare tromboembolismo polmonare, violente reazioni infiammatorie polmonari e sistemiche, talora fatali. La maggior parte dei gatti tuttavia va incontro a infestazioni asintomatiche o con segni clinici alquanto aspecifici (es. sintomi respiratori cronici, vomito ed anoressia).



*Figura 1 – Alcune filarie adulte all'interno delle camere cardiache di un gatto.*

Le forme sottocutanee di filariosi sono diagnosticate raramente, in quanto quasi sempre asintomatiche: solitamente i parassiti vengono identificati all'interno di lesioni nodulari dopo FNA o accidentalmente durante chirurgia ed esami istologici.

Per i vari aspetti sopra descritti la diagnosi è difficile: rilevare micro filarie è alquanto raro, mentre i classici test antigenici utilizzati nel cane, hanno nel gatto una bassa sensibilità a causa del ridotto numero di parassiti adulti. Più sensibili sono invece i test indiretti, che permettono l'identificazione di pazienti sieropositivi, che hanno cioè sviluppati anticorpi contro gli antigeni parassitari. Per le medesime ragioni (pauciparassitismo) anche l'ecocardiografia, utilizzata per rilevare parassiti adulti nelle camere cardiache, non è dotata di elevata sensibilità (Vedi schema in Figura 3).



*Figura 2 – Microfilaria accidentalmente rilevata durante un esame citologico in un gatto.*

Non ci sono trattamenti adulticidi approvati e standardizzati come per il cane, anche perché la maggior parte dei gatti si libera dell'infestazione in pochi mesi/anni. Trattamenti cortisonici e terapia intensiva sono invece indicati e necessari in caso di pazienti con sintomi respiratori severi, shock e tromboembolismo. Nelle aree a rischio, sono invece indicati i trattamenti chemio profilattici per prevenire lo svi-

luppo di parassiti adulti, a base di ivermectina, mibelmicina ossima, moxidectina, selamectina ed eprinomectina (principi attivi e relativi prodotti commerciali diversi per nazioni).

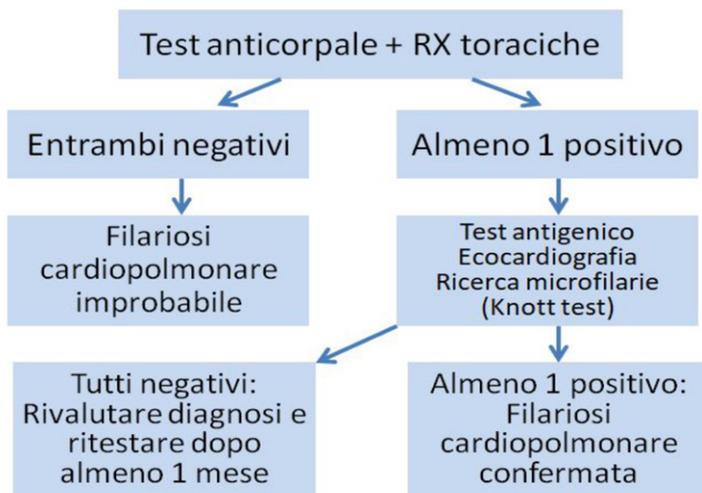


Figura 3 – Schema consigliato da Pennisi et al (JFMS 2020) per l’approccio diagnostico alla filariosi polmonare del gatto.

**Luigi Venco**, Med. Vet. EBVS European Veterinary Parasitology Specialist (Dipl. EVPC); Esperto MYLAV.

**Walter Bertazzolo**, Med. Vet. EBVS European Specialist in Veterinary Clinical Pathology (Dipl. ECVCP); Direttore Scientifico di MYLAV.

## SOMMARIO

- 8** OCCHIO ALLA RAZZA!

---

- 12** VARIABILITÀ ANALITICA E BIOLOGICA: PRENDIAMO ESEMPIO DALLA CONCENTRAZIONE URINARIA

---

- 15** LA VALUTAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DELLE URINE: PS E OSMOLALITÀ

---

- 18** COLORAZIONI ISTOCHIMICHE ED IMMUNOISTOCHIMICHE

---

- 26** CHE SUCCEDA A QUESTO BIOCHIMICO? – ERRORI DA EVITARE

---

- 27** IL TIPO DI PRELIEVO DI URINE INFLUISCE SU PROTEINURIA E CORTISOLURIA?

---

- 29** DI FILARIOSI CARDIOPOLMONARE NEL CANE

---

- 33** OPS – L'ACTH MI È USCITO FUORI VENA... CHE FACCIO CON IL MIO TEST DI STIMOLAZIONE?

---

- 35** L'ASPIRAZIONE DELLE LESIONI SURRENALICHE È RISCHIOSA?

---

- 38** PARR: ISTRUZIONI E AGGIORNAMENTI PER UN CORRETTOUTILIZZO

---

- 44** COME PREPARARE I PEZZI CHIRURGICI PER LA VALUTAZIONE DEI MARGINI DI ESCISSIONE

---

- 52** COME EFFETTUARE UN CORRETTO CAMPIONAMENTO PER L'ESAME TRICOSCOPICO E LE SUE FINALITÀ

---

- 56** IL MASTOCITOMA DERMICO DEL CANE: COSA È NECESSARIO FARE

---

- 64** IL MASTOCITOMA SOTTOCUTANEO DEL CANE: COSA POSSIAMO FARE?

---

- 68** LE MALATTIE TRASMESSE DA VETTORI IN ITALIA: DIFFUSIONE E PREVALENZA

---

- 73** ERRORI DA EVITARE: COME NON STRISCIARE UN CAMPIONE DI MIDOLLO OSSEO

---

- 76** COME VALUTARE LA SALUTE DEL CANE IN BASE ALLA SUE ETÀ: LE LIFE STAGE GUIDELINES

---

- 82** COME VALUTARE LA SALUTE DEL GATTO IN BASE ALLA SUE ETÀ: LE LIFE STAGE GUIDELINES

---

- 87** ERRORI DA EVITARE: FARE ESAMI DI APPROFONDIMENTO PRIMA DI QUELLI DI BASE

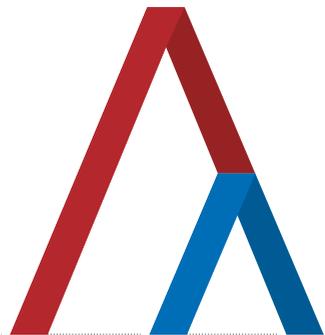
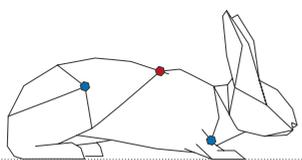
---

- 90** IL RUOLO DEI VIRUS NELL'ONCOGENESI DEI TUMORI DEL CANE

---

- 92** NODULI SPLENICI DEL CANE: QUANTI SONO REALMENTE NEOPLASTICI E MALIGNI?

- 97** RETROVIROSI FELINE (FIV E FELV): LE NUOVE LINEE GUIDA 2020 DELL'AMERICAN ASSOCIATION OF FELINE PRACTITIONERS (AAFP)
- 
- 104** ERRORI DA EVITARE: IL GEL ECOGRAFICO, AMICO DEL RADIOLOGO, NEMICO DEL CITOLOGO
- 
- 107** PERCHÈ È IMPORTANTE L'ISTOLOGICO LINFONODALE DELL'ITER DIAGNOSTICO DI UN SOSPETTO LINFOMA?
- 
- 111** LA POLIARTRITE IMMUNO-MEDIATA: COME FACCIO A FARE LA DIAGNOSI?
- 
- 118** LA POLIARTRITE IMMUNO-MEDIATA COME FACCIO A TRATTARLA E MONITORARLA?
- 
- 123** ALCUNE NOVITA' SU SDS-AGE NEL GATTO NEFROPATICO
- 
- 126** LINFONODI INTRA-ADDOMINALI MEGALICI NEL GATT: LA COTOLOGIA SPESSO NON BASTA
- 
- 129** IMPORTANZA DELLA BATTERIURIA DA ENTEROCOCCUS SPP. NEL CANE
- 
- 131** LE MALATTIE INFETTIVE NEGLETTE DEL GATTO: LA LEPTOSPIROSI
- 
- 135** UN NUOVO MARKER DI DANNO RENALE: LA MISURAZIONE DEL NGAL NELLE URINE
- 
- 138** LA SAA NEL CANE
- 
- 140** COME E QUANDO DOSARE IL RAME NEL FEGATO?
- 
- 144** A COSA SERVE LA MISURAZIONE DEGLI ANTICORPI ANTI-GANGLIOSIDI NEGLI UCCELLI?
- 
- 147** LE MALATTIE INFETTIVE NEGLETTE DEL GATTO: LA FILARIOSI
-



**MYLAV s.r.l.u.**

SEDE LEGALE: Via Vecchia Montesardo, 21  
73031 Alessano (LE)

SEDE DEL LABORATORIO: Via G. Sirtori, 9  
20017 Passirana di Rho (MI) - Tel: +39 02 931 1172  
info@laboratoriolavallonea.it

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

