

CORNER DIAGNOSTICO

Citologia



Ugo Bonfanti,
Med Vet Dipl. ECVCP,
Laboratorio La Vallonée,
Alessano (Le)
ugobonfanti@laboratoriolavallonea.it

Giusy Rinaldi, Med Vet,
Clinica Veterinaria Città
di Catania, Catania

CORNER DIAGNOSTICO

Un cane meticcio, femmina di 3 anni, veniva condotta alla visita per vomito, anoressia, depressione del sensorio, debolezza, ematuria e stranguria. Il cane viveva in giardino e, per quanto non costantemente sotto il controllo dei proprietari, in anamnesi non veniva riportato alcun problema pregresso. Da circa tre giorni il paziente presentava anoressia, debolezza ed inizialmente ematuria, con successiva rapida evoluzione a stranguria, e comparsa di vomito. Alla visita clinica il paziente appariva depresso; veniva riscontrato dolore addominale, ed alla palpazione si avvertiva una voluminosa neoformazione a carico dell'addome caudale. L'esame radiografico del torace non rilevava anomalie particolari. L'esame ecografico e TC dell'addome mostravano ispessimento generalizzato della parete vescicale e la presenza di una neoformazione a carattere infiltrante all'interno della vescica stessa che infiltrava la porzione distale dell'uretere di sinistra (Figura 1). Entrambi gli ureteri apparivano visibilmente dilatati, soprattutto il sinistro, con grave idronefrosi sinistra e pielectasia del rene omolaterale. Si rilevava inoltre aumento di volume dei linfonodi regionali, mentre l'addome craniale non presentava anomalie di rilievo. Si effettuava un esame emocromocitometrico, riassunto in tabella 1, che mostrava lieve anemia e linfopenia. La stima piastrinica era adeguata. La biochimica clinica metteva in rilievo grave azotemia (urea: 450 mg/dL – V.R. 10-60 mg/dL) e ipercreatinemia (5,8 mg/dL – V.R.: 0,3-1,4 mg/dL). L'emogas venoso mostrava lieve acidosi metabolica, iperpotassiemia (6,1 mmol/L – V.R.: 3,4-4,9 mmol/L), iponatremia (109 mmol/L – V.R.: 142-150 mmol/L), ipocloremia (66 mmol/L – V.R.: 106-127 mmol/L) ed aumento dei lattati (4,1 mmol/L – V.R.: 0,6-2,9 mmol/L). L'esame delle urine evidenziava urine isostenuriche (PS 1012) e presenza di sedimento attivo con numerosi eritrociti e leucociti. Dopo iniziale stabilizzazione del paziente si decideva per l'applicazione di un bypass vescicale, uretero-uretrale inserito nell'uretere destro, al fine di consentire il deflusso dell'urina, dall'unico rene che conservava ancora parte della sua struttura. All'esplorazione chirurgica la parete vescicale appariva uniformemente ispessita e lo sbocco di entrambi gli ureteri non era visibile perché completamente oblitterati dal tessuto neoformato. Nella stessa sede venivano eseguite biopsie incisionali della parete vescicale a tutto spessore e prelievi effettuati dal tessuto patologico che ostruiva lo sbocco ureterale di destra e da quello che interessava la porzione distale dell'uretere di sinistra. Nel contempo venivano eseguite alcune apposizioni dei frammenti biotipici prelevati, prima che gli stessi venissero messi in formalina. Alcune apposizioni venivano colorate con May-Grunwald Giemsa, ed altre venivano lasciate asciugare all'aria per eventuali ulteriori indagini e colorazioni speciali.

- 1) Qual è la popolazione cellulare prevalente identificata nelle figure 2 e 3?
- 2) Definita l'origine delle cellule, possiamo caratterizzarle citologicamente con maggiore precisione?
- 3) In base alle immagini, possiamo emettere una diagnosi precisa?
- 4) Come possiamo confermare la nostra ipotesi diagnostica?

Tabella 1 - Esame emocromocitometrico alla presentazione

	Valore paziente	Intervallo di riferimento
Eritrociti ($10^6/\mu\text{L}$)	4.20	6.0-17.0
Emoglobina (g/dL)	10.3	12.0-18.0
Ematocrito (%)	28.6	37.0-55.0
MCV (fL)	68	60-77
MCH (pg)	24.6	20.0-25.0
MCHC (g/dL)	36.2	31.0-39.0
Leucociti ($10^3/\mu\text{L}$)	8.2	6.0-17.0
Neutrofili banda ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0	0-0.3
Neutrofili segmentati ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	6.8	3-11.5
Linfociti ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0.4	1-4.8
Monociti ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0.9	0.2-1.4
Eosinofili ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0.1	0.1-1.3
Basofili ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0	0-0.1
Piastrine ($10^3/\mu\text{L}$)	121	200-500

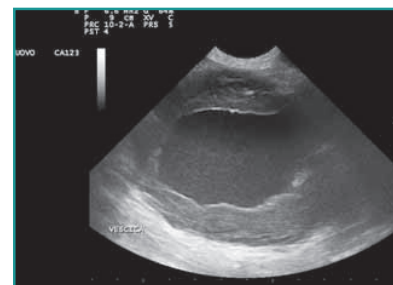


Figura 1 - Ecografia vescicale: ispessimento generalizzato della parete vescicale.

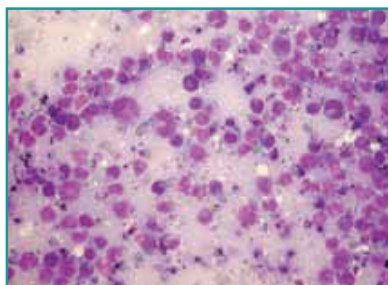


Figura 2 - Esame citologico del prelievo ottenuto mediante apposizione dalla lesione vescicale (May-Grunwald Giemsa, 400x).

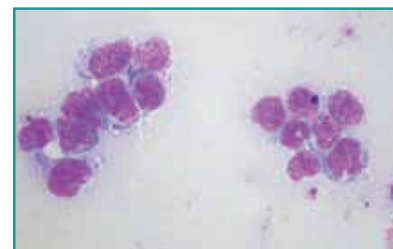


Figura 3 - Esame citologico del prelievo ottenuto mediante apposizione dalla lesione vescicale (May-Grunwald Giemsa, 1000x).

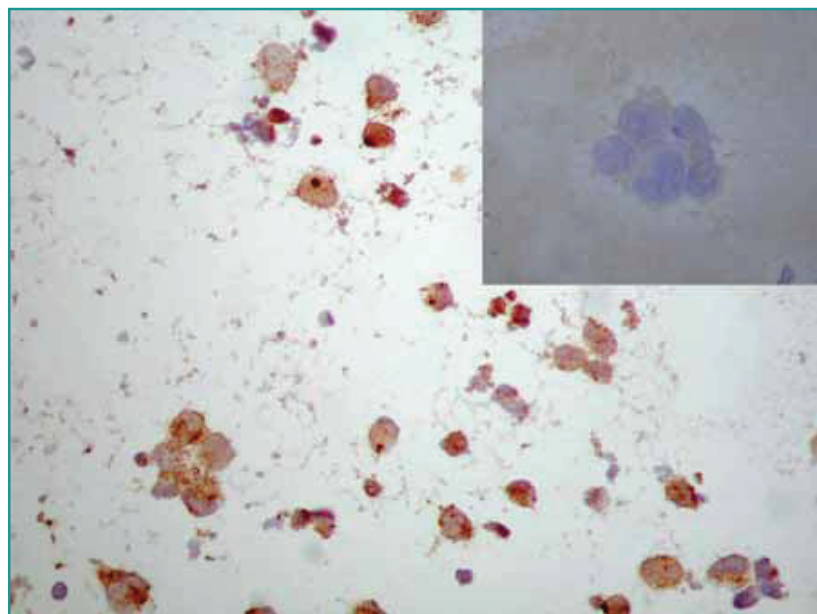


Figura 4 - Colorazioni immunocitochimiche. Colorazione CD3 positiva. Nel riquadro in alto a destra: Colorazione CD20 negativa (400x - 1000x).

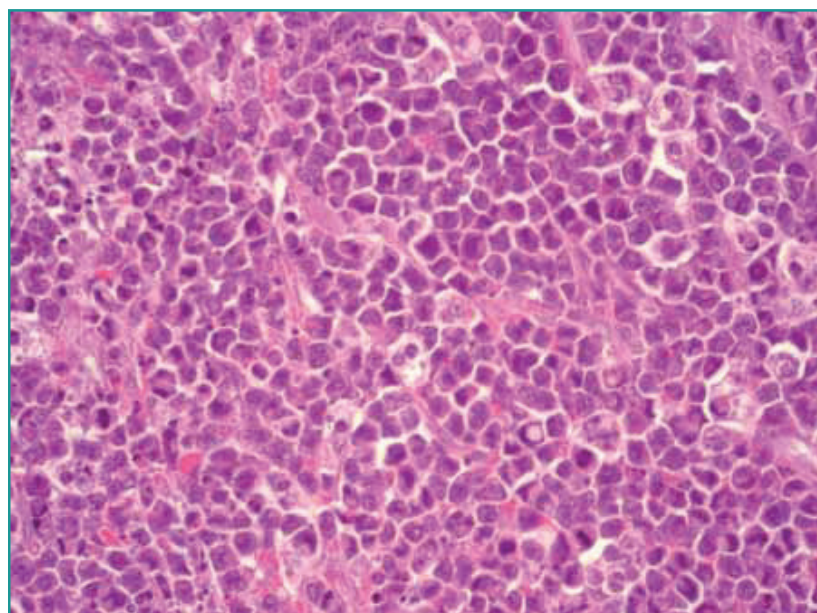


Figura 5 - Esame istologico di frammento di parete vescicale (Ematossilina Eosina, 10x).

1) La popolazione cellulare prevalente è rappresentata da elementi tondeggianti a margini netti, con scarso citoplasma debolmente basofilo, spesso contenente microvacuolizzazioni otticamente vuote. Il nucleo è di grandi dimensioni, di forma tondeggianta, ovalare, talora irregolare e profondamente convoluto, con cromatina finemente punteggiata e nucleoli solo occasionalmente visibili.

2) Le cellule sono morfologicamente riconducibili ad elementi linfoidi immaturi. L'irregolarità del profilo del nucleo fa propendere per elementi linfoidi T.

3) La diagnosi citologica più probabile è rappresentata da un linfoma di grado elevato, a probabile fenotipo T.

4) La nostra ipotesi diagnostica potrebbe venir confermata da colorazioni immunocitochimiche e dalla valutazione istopatologica dei frammenti prelevati. In particolare, su apposizioni non colorate venivano applicate colorazioni immunocitochimiche, impiegando anticorpi anti CD3 ed anti CD20, diretti contro antigeni cellulari dei linfociti T e B rispettivamente (Figura 4) che confermavano una netta positività per gli anticorpi anti CD3 (linfoma T). La valutazione istopatologica mostrava la parete vescicale completamente sovrastata da infiltrazione neoplastica rotondocellulare costituita da cellule voluminose, con nucleo pleomorfo, ipercromico, con cromatina reticolare e due o più nucleoli, citoplasma scarso ed eosinofilo. Erano inoltre presenti diffusi fenomeni intraneoplastici di necrosi. Aree della tonaca muscolare mostravano infiltrazione neoplastica rotondocellulare che dissecava la muscolare. Anche la sierosa appariva diffusamente infiltrata, con fenomeni necrotico-emorragici che coinvolgevano il tessuto adiposo. La diagnosi istologica finale è stata di linfoma vescicale di grado elevato, a fenotipo T (Figura 5).

DISCUSSIONE

Sebbene l'incidenza annua sia difficile da dimostrare in assenza di un registro nazionale dei tumori negli animali domestici, il linfoma costituisce una delle neoplasie più frequenti nella specie canina¹. In particolare rappresenta dal 7 al 24% delle neoplasie del cane e circa

l'83% delle neoplasie dell'apparato ematolinfopoietico. L'incidenza di linfoma canino è maggiore in animali di età compresa tra i 6 ed i 9 anni¹. Il linfoma primario vescicale nell'uomo è molto raro, ed ancor più infrequente nel cane². In particolare, il linfoma che coinvolge la vescica fa soprattutto parte del quadro multicentrico, generalizzato, in cui si verifica diffusione secondaria alla parete vescicale, mentre solo raramente è di origine primaria².

Tra i rari casi riportati in letteratura si segnala quello di un cane meticcio, femmina, di 7 anni con ematuria, e con presenza di una voluminosa neoformazione intravescicale compatta, di circa 6 cm di diametro in partenza dalla superficie ventrale della vescica senza apparente interessamento del trigono. Non vi era interessamento di altre strutture addominali. In superficie di taglio la mucosa vescicale risultava estremamente ispessita. Istologicamente, mucosa e sottomucosa erano massivamente infiltrate da cellule linfoidi atipiche, di medie e grandi dimensioni. Alla colorazione immunocitochimica le cellule linfoidi risultavano CD3 positive, supportando pertanto la diagnosi di linfoma T epiteliotropo². In un secondo cane, meticcio, femmina sterilizzata di 3 anni, con sintomi di ematuria e disuria è stato diagnosticato un linfoma vescicale primario - senza coinvolgimento di altri organi addominali - di grado elevato, a fenotipo B³.

In un'ultima pubblicazione sono infine riportati tre casi di linfoma vescicale. In un primo caso si trattava di un Weimaraner, femmina, di 8 anni in cui era presente una neoformazione vescicale singola, identificata ecograficamente e biopsata istologicamente, con ampia base di insorgenza e coinvolgimento della sierosa, in partenza dalla parete vescicale. In concomitanza erano presenti idronefrosi ed idrouretere destri, oltre a linfadenomegalia addominale, mandibolare e cervicale, e noduli epatici e splenici. In un secondo caso, in uno Springer Spaniel, maschio sterilizzato, di 7 anni, era presente una neoformazione vescicale a livello del trigono, con alterazione della superficie mucosale ed invasione della sierosa, con idronefrosi ed idrouretere destri oltre a prostatomegalia e a linfadenomegalia dei linfonodi perirenali ed iliaci mediali. La diagnosi di linfoma è stata emessa sulla base dell'esame citologico del sedimento urinario e sulla biopsia citologica di prostata e linfonodi iliaci. Il terzo caso è stato descritto in un Labrador, maschio sterilizzato, di 4 anni, con ispessimento mucosale del trigono, con superficie mucosale regolare - confermato con uretrocistografia a doppio contrasto - concomitante idronefrosi ed idrouretere più evidenti a sinistra. In questa occasione era presente anche ispessimento ureterale. In quest'ultimo caso la diagnosi è stata confermata istologicamente e la concomitante valutazione immunoistochimica ha permesso di identificare un linfoma a fenotipo T⁴.

Le forme neoplastiche linfoproliferative a fenotipo T posseggono talora caratteristiche citomorfologiche ben individuabili e descritte in letteratura. In particolare, le forme neoplastiche linfomatose di grado elevato si caratterizzano più spesso per nuclei dal profilo irregolare o convoluto, citoplasma moderatamente ampio e chiaro, raramente contenente punteggiature rossastre. Infine è descritta una percentuale moderata, ma facilmente rico-

noscibile, di plasmacellule mature, ben differenziate, espressione del normale processo maturativo degli elementi linfoidi B rimanenti^{5,6}.

La colorazione immunocitochimica in questi casi può rappresentare un valido ausilio diagnostico. L'immunocitochimica può essere impiegata in numerose preparazioni citologiche quali strisci diretti, cytospin e preparati in "fase liquida" (*"liquid-based" preparations*). Inoltre, le colorazioni immunocitochimiche possono essere impiegate con profitto anche su preparati precedentemente colorati con colorazioni "tipo Romanowsky" o Papanicolau, nel caso non siano disponibili altri allestimenti, anche se ci possono essere degli inconvenienti durante la procedura di decolorazione quali perdita di cellule dal vetrino, e/o distruzione delle cellule stesse con conseguente mancata colorazione. Nei casi in cui sia disponibile un solo campione, se dotato di cellularità sufficiente, sarà possibile approntare colorazioni multiple sullo stesso preparato⁷.

Occorre infine sottolineare come la colorazione immunocitochimica rappresenti una metodica aggiuntiva, da interpretarsi assieme a rilievi clinici, clinicopatologici, citologici ed eventualmente istopatologici, se disponibili^{7,8}.

RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano la D.ssa Stefania Carco' per l'immagine ecografica, il Dr. Giovanni Tortorella per l'immagine istologica, e tutto lo Staff della Clinica Veterinaria Città di Catania per il supporto fornito nella gestione del caso.

BIBLIOGRAFIA

1. Vail DM, Pinkerton ME, Young KM. Canine Lymphoma and Lymphoid Leukemias. In: Withrow SJ, Vail DM. Ed. Small Animal Clinical Oncology. St. Louis: Elsevier, 2013, pp. 608-638.
2. Maiolino P, DeVico G. Primary Epitheliotropic T-cell Lymphoma of the Urinary Bladder in a Dog. *Veterinary Pathology* 37:184-186, 2000.
3. Kessler M, Kandel-Tschiederer B, Pflieger S, et al. Primary malignant lymphoma of the urinary bladder in a dog: longterm remission following treatment with radiation and chemotherapy. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 150:565-569, 2008.
4. Benigni L, Lamb C, Corzo-Menendez N, et al. Lymphoma affecting the urinary bladder in three dogs and a cat. *Veterinary Radiology and Ultrasound* 47:592-296, 2006.
5. Fournel-Fleury C, Ponce F, Felman P, et al. Canine T-cell Lymphoma: A Morphological, Immunological and Clinical Study of 46 new cases. *Veterinary Pathology* 39:92-109, 2002.
6. Ponce F, Marchal T, Magnol JP, et al. Comparative Similarities Between Canine and Human Lymphoma Morphology. A Morphological Study of 608 Cases of Canine Malignant Lymphoma in France With a Focus on Comparative Similarities Between Canine and Human Lymphoma Morphology. *Veterinary Pathology* 47:414-433, 2010.
7. Ramos-Vara JA, Avery PR, Avery AC. Advanced Diagnostic Technique. In: Raskin RE, Meyer DJ. Ed. Canine and Feline Cytology: A Color Atlas and Interpretation Guide. St. Louis: Elsevier, 2016, pp. 453-494.
8. Priest HL, Hume KR, Killick D, et al. The use, publication and future directions of immunocytochemistry in veterinary medicine: a consensus of the Oncology-Pathology Working Group. *Veterinary and Comparative Oncology*. DOI: 10.1111/vco.12228, 2016.