

# CORNER DIAGNOSTICO

## Citologia



CORNER DIAGNOSTICO

### PRESENTAZIONE CLINICA

Un cane maschio di razza Spitz, di provenienza estera (Romania) e di età dichiarata di 5 mesi veniva presentato per debolezza, diarrea con sangue e vomito non alimentare. L'anamnesi riferiva che il cane era stato acquistato in Italia tramite internet e non aveva completato il ciclo vaccinale corretto. Alla visita clinica il cane era normotermico ( $T 38,5^{\circ}\text{C}$ ) e presentava mucose rosee, frequenze cardiaca e respiratoria nella norma ed addome trattabile, non dolente e leggermente disteso. Venivano eseguiti test antigenici per la ricerca di Parvovirus, Coronavirus e Giardia su tampone fecale (CPV/CCV/Giardia Ag Test Kit - Bio-Note) con risultato negativo, ed esame parassitologico delle feci per flottazione, risultato positivo per coccidi. Nei giorni seguenti alla somministrazione di un farmaco antiprotozoiario, il cane presentava ripetuti episodi di scialorrea e disorientamento non correlati alla fase alimentare della durata di pochi secondi. Venivano eseguiti esami ematochimici completi, elettroforesi sieroproteica ed esami sierologici tramite immunofluorescenza indiretta per *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum*, tutti con risultati privi di anomalie rilevanti, ad eccezione per alcuni rilievi ematologici (vedi Tabella 1). In Figura 1 e 2 sono riportate immagini significative dello striscio ematico. L'esame radiografico di torace e addome non mostrava alterazioni evidenti. Il cane veniva ricoverato il giorno successivo per la comparsa di cluster epilettici e per l'insorgenza di una sintomatologia respiratoria (scolo nasale e oculo-congiuntivale purulento, tachipnea ed aumento del murmure respiratorio).

- 1) Quali alterazioni ematologiche sono presenti?
- 2) Cosa osservi nello striscio di sangue periferico in Figura 1 e 2?
- 3) Dato il quadro ematologico ed i dati clinici, quale ipotesi eziopatogenetica sospetti?
- 4) Come confermeresti la tua diagnosi presuntiva?

Risposte alle pagine successive

Tabella 1 - Esame emocromocitometrico		
	Valore paziente	Intervallo di riferimento
RBC $10^6/\mu\text{L}$	4,05	5,5-7,9
Hgb g/dL	8,3	12-18
HCT %	26,4	37-55
MCV fL	65	60-76
MCH pg	20,4	20-25
MCHC g/dL	31,3	32-39
WBC	17700	6000-17000
Neutrofili banda/ $\mu\text{L}$	0	0-300
Neutrofili segmentati/ $\mu\text{L}$	15930	3000-11500
Linfociti/ $\mu\text{L}$	885	1000-4800
Monociti/ $\mu\text{L}$	885	150-1350
Eosinofili/ $\mu\text{L}$	0	100-1250
Basofili/ $\mu\text{L}$	0	rari
PLT $10^3/\mu\text{L}$	62 (stima inadeguata)	240-400

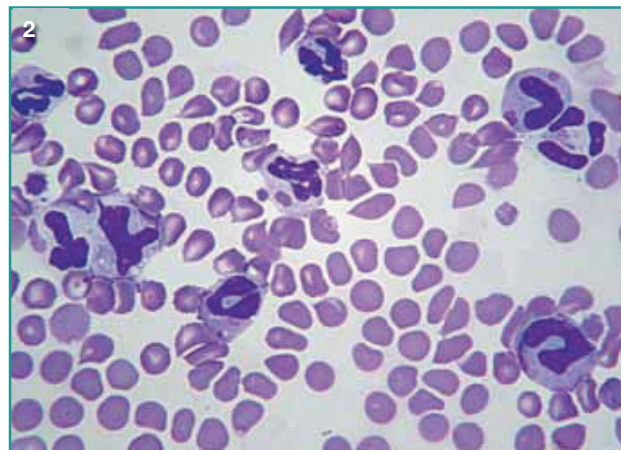
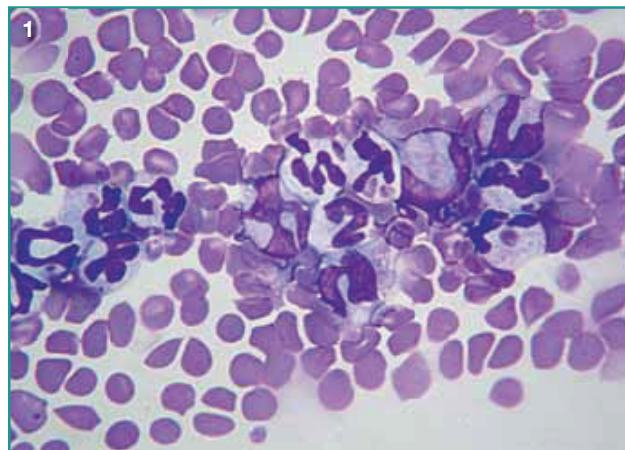


Figura 1 e 2 - Striscio ematico in un cane.

## RISPOSTE

- 1) Anemia normocitica normocromica di grado modesto; trattandosi di un cane giovane, la gravità dell'anemia non va sopravvalutata; lieve leucocitosi con neutrofilia e linfopenia; grave trombocitopenia.
- 2) L'osservazione dello striscio di sangue periferico permette di evidenziare corpi inclusi intracitoplasmatici acido-fili all'interno di granulociti neutrofili, eritrociti e monociti; queste formazioni presentano aspetto e forma irregolare, ma con colore uniformemente rosato e con dimensioni variabili (circa 1-5  $\mu\text{m}$  di diametro) (Figure 3 e 4, frecce).
- 3) Tali corpi inclusi sono riferibili ad una infezione da virus del cimurro.
- 4) La diagnosi può essere avvalorata da tecniche molecolari (es. PCR) su sangue e tessuti infetti e liquido cefalo-rachidiano. Nel nostro caso la PCR, eseguita su sangue periferico, ha dato esito positivo per la ricerca del virus del cimurro.

## DISCUSSIONE

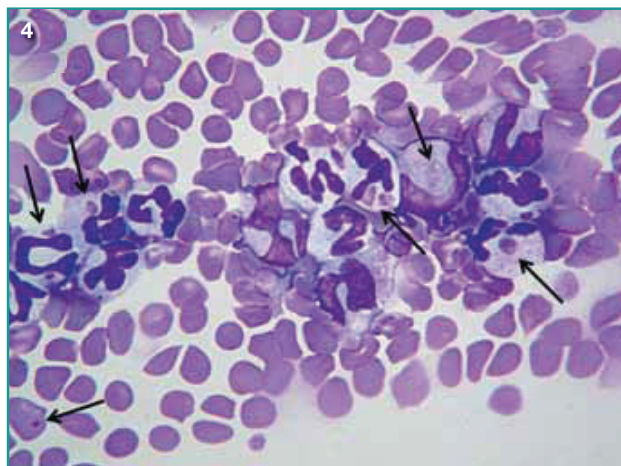
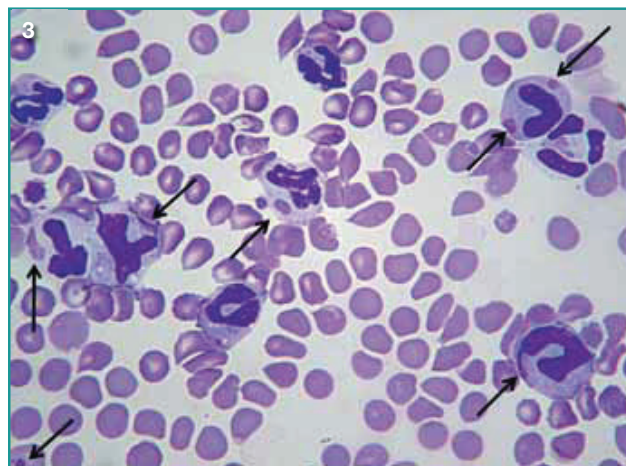
Il virus del cimurro (Canine Distemper Virus, CDV) è un virus a RNA incluso nel genere *Morbillivirus* della famiglia *Paramyxoviridae* la cui virulenza varia a seconda della linea genetica e dello stato immunitario dell'ospite. Lo spettro degli ospiti naturali comprende cani e molti altri carnivori e non carnivori oltre a mammiferi marini. La trasmissione del virus avviene tramite aerosol ed essudati orali, respiratori e congiuntivali; in minor misura con altri secreti ed escreti (feci, urine e saliva). Poiché il virus è molto labile nell'ambiente, è necessario uno stretto contatto per la diffusione dell'infezione. L'escrezione del virus avviene circa 7 giorni post-infezione e può perdurare per periodi variabili dai 60 ai 90 giorni dall'infezione naturale. Una volta penetrato all'interno dell'organismo, il virus replica nei macrofagi

e nelle cellule linfoidi localizzate nelle vie aeree superiori. Dopo circa una settimana, con l'inizio della viremia, il virus diffonde a livello sistemico infettando linfociti, monociti e piastrine ed in seguito si localizza (principalmente) a livello respiratorio, cutaneo e gastroenterico. Infine, in 8-9 giorni raggiunge il sistema nervoso centrale ed altri tessuti epiteliali e viene eliminato attraverso secreti ed escreti.<sup>1,2</sup>

Sono sensibili cani di tutte le età non correttamente vaccinati, ma la malattia è più comune nei cuccioli di 3-6 mesi. La risposta immunitaria dell'ospite condiziona le manifestazioni cliniche e l'evoluzione della patologia:

- risposta immunitaria forte: cani con buona risposta cellulo-mediata e titoli anticorpali elevati e precoci, entro il 14° giorno eliminano il virus da tutti i tessuti e che non manifestano sintomatologia;
- risposta immunitaria intermedia: la sintomatologia può essere blanda o clinicamente silente ma il virus persiste a livello cutaneo, polmonare e nervoso. Questi animali possono andare incontro a guarigione completa o manifestare sintomi clinici di malattia in caso di reinfezione;
- risposta immunitaria inadeguata: la replicazione virale è massima tra i 9 e i 14 giorni nelle cellule epiteliali degli apparati respiratorio, gastroenterico e genitourinario con morte dell'animale per patologia multisistemica in poche settimane.

Nella fase di viremia i cani manifestano sintomi per lo più aspecifici quali febbre, abbattimento, intolleranza all'esercizio, anoressia, lieve disidratazione. Con il progredire della patologia, vengono coinvolti gli apparati respiratorio e gastroenterico con una sintomatologia più o meno grave a seconda dello stato immunitario dell'ospite: tosse produttiva e dispnea (a causa di bronchite e/o polmonite catarrale), scolo oculocongiuntivale muco-pu-



**Figura 3 e 4** - Nelle stesse immagini di Figura 1 e 2, sono stati evidenziati dalle frecce i numerosi corpi inclusi eosinofili intra-citoplasmatici presenti all'interno dei granulociti neutrofili, dei monociti e di alcuni eritrociti (Diff-Quick, 1000x).

rulento, mucose congeste, vomito e diarrea emorragica. Compaiono inoltre lesioni a carico di vari epiteli che possono esitare in cheratocongiuntivite secca, ipercheratosi del tartufo e dei cuscinetti plantari ed ipoplasia dello smalto dentale.

I segni che coinvolgono il SNC compaiono generalmente circa 20 giorni dopo la guarigione dalla patologia sistemica ma possono svilupparsi anche dopo alcuni mesi e comprendono opistotono, atassia, crisi convulsive, paralisi e mioclonie localizzate od estese. I soggetti che manifestano sintomatologia neurologica solitamente presentano una risposta immunitaria scarsa o insufficiente. Esiste infine un'altra patologia correlata all'infezione da CDV: l'encefalite del cane anziano. Essa consiste in una panencefalite cronica progressiva che colpisce cani immunocompetenti di età superiore ai 6 anni con comparsa di alterazioni comportamentali, movimenti di anteropulsione e di circolo, diminuzione dei riflessi posturali e cecità centrale.<sup>1</sup>

Il sospetto di infezione da CDV è basato sulla sintomatologia clinica e sulla giovane età dell'animale con anamnesi vaccinale inadeguata. All'esame emocromocitometrico non si riscontrano alterazioni particolarmente rilevanti (ad eccezione di una marcata linfopenia che interessa sia i linfociti T che i B). I valori biochimici risultano essere solitamente nella norma.

La diagnosi eziologica è possibile mediante metodi diretti (ricerca del virus) ed indiretti (analisi della risposta immunitaria dell'ospite), ma questi ultimi sono poco affidabili in quanto i risultati sono variabili e dipendono dallo stadio della malattia, dagli eventuali trattamenti vaccinali e dagli anticorpi di origine materna.<sup>2</sup>

L'esame istologico (e citologico) permette di evidenziare la presenza di corpi inclusi in cellule epiteliali congiuntivali e vaginali, di vie urinarie, cute e da campioni biopatici di stomaco, liquido cefalorachidiano e tessuto nervoso e viene considerato un buon indicatore per la diagnosi intra-vita, e post-mortem di infezione da CDV. I corpi inclusi non sono altro che delle inclusioni cellulari rappresentanti la traccia visibile dell'assemblaggio delle particelle virali all'interno del citoplasma delle cellule infette. Nell'infezione da CDV essi sono acidofili (rosati), di forma rotondeggiante/ovalare e di circa 1-5 µm di diametro. Nella fase viremica tra il 7° e il 9° giorno essi possono essere riscontrati citologicamente nel san-

gue periferico all'interno di eritrociti, piastrine, granulociti neutrofili e monociti.

Tuttavia, la loro presenza in preparati citologici ed istologici ha una sensibilità bassa poiché non sempre sono ben evidenti e spesso non si colorano con le normali colorazioni utilizzate in citologia (tipo Romanowsky).<sup>3</sup> Un altro metodo diretto di ricerca dell'agente eziologico è la RT-PCR, in grado di rilevare l'RNA del virus nei tessuti e nei fluidi biologici infetti. Sebbene la sua sensibilità sia fortemente influenzata dal tipo di primers selezionati, questo sistema di rilevamento dell'acido nucleico rappresenta un metodo altamente sensibile e specifico per la diagnosi di cimurro nel cane, indipendentemente dalla forma di cimurro, dalla risposta immunitaria umorale, e dalla distribuzione antigenica. I campioni più consigliati per la ricerca dell'RNA virale sono sangue e urine, di facile campionamento e con sensibilità diagnostica elevata e persistente anche per parecchie settimane post-infezione.<sup>4</sup>

Sono state infine studiate ulteriori tecniche per evidenziare il virus del CDV (isolamento virale su cellule epiteliali e fibroblasti, immunofluorescenza, immunocitostochimica, ibridazione in situ). La maggior parte di questi metodi però sono laboriosi e richiedono tempo e, soprattutto, sono di utilità limitata quando applicati a campioni clinici.

In conclusione, a causa del decorso imprevedibile e variabile del cimurro, per la durata della viremia, la diversa manifestazione d'organo e la differente risposta immunitaria dell'ospite, la diagnosi antemortem per la maggior parte degli animali può rimanere incerta.<sup>2,3</sup>

## BIBLIOGRAFIA

1. Lappin MR. Virus del cimurro del cane. In: Medicina Interna del cane e del gatto. Nelson RW, Couto CG et al., 4° edizione, Elsevier Srl, Milano, 2010, pp. 1336-1338.
2. Elia G, Camero M *et al.* Il cimurro del cane: aspetti diagnostici e scelta dei campioni in funzione della dinamica virologica e sierologica. *Veterinaria* 30 (3): 177-183, 2016.
3. Kubo T, Kagawa Y *et al.* Distribution of Inclusion Bodies in Tissues from 100 dogs Infected with Canine Distemper Virus. *Journal of Veterinary Medical Science* 69 (5): 527-529, 2007.
4. Frisk AL, König M *et al.* Detection of Canine Distemper Virus Nucleoprotein RNA by Reverse Transcription-PCR Using Serum, Whole Blood, and Cerebrospinal Fluid from Dogs with Distemper. *Journal of Clinical Microbiology* 37 (11): 3634-3643, 1999.