

Esame dei versamenti del cane e del gatto: interpretazione e diagnosi citologica



L'esame citologico è un test imprescindibile e di indubbia utilità nell'approccio diagnostico dei versamenti cavitari. Attraverso la descrizione citologica degli elementi presenti nel versamento, unita ai risultati dei test di laboratorio tra cui la conta cellulare e gli esami di chimica clinica, è possibile eseguire una prima classificazione e restringere il campo delle diagnosi differenziali eziologiche. In molte situazioni, come nel caso degli essudati settici o asettici, l'esame citologico è necessario e sufficiente a ottenere informazioni sulle possibili cause sottostanti e conseguentemente a suggerire al clinico un primo rapido piano diagnostico e terapeutico. Nonostante l'accuratezza diagnostica della citologia per identificare la causa di alcuni tipi di versamento non sia elevata, come nel caso dei versamenti neoplastici, l'esame citologico è in ogni caso un tassello fondamentale per impostare l'ulteriore iter diagnostico atto a determinare le cause e la patogenesi del versamento.



Marco Giraldi
Med. Vet., PhD



Ugo Bonfanti
Med. Vet., EBVS®
European
Specialist in
Veterinary
Clinical Pathology

I versamenti cavitari sono definiti come l'accumulo di liquido nelle cavità pleuriche, pericardica e peritoneale. Sono la conseguenza di differenti e spesso gravi patologie e sono essi stessi causa di complicazioni cliniche. Fisiologicamente le cavità sierose contengono una quantità di liquido tale da costituire un sottile strato interposto tra le superfici parietali e viscerali, necessario a facilitare la mobilità degli organi contenuti nel loro interno e, nel caso delle pleure, a contrastare il collasso dei polmoni e permettere la respirazione. Le forze pressorie e le componenti anatomiche deputate alla produzione e al riassorbimento del liquido cavitario sono costantemente in equilibrio tra loro in modo da mantenerne invariati volume e composizione chimica, proteica e cellulare. La perdita di questo equilibrio, per eccessiva produzione, riduzione del riassorbimento o entrambi, determina la formazione del versamento cavitario. I meccanismi patologici responsabili della formazione del versamento possono essere suddivisi in 3 categorie: 1) alterazione di pressione tra liquido cavitario e spazio interstiziale o sangue (riduzione pressione oncotica pla-

smatica o aumento della pressione idraulica plasmatica), 2) ostacolo al drenaggio linfatico, 3) aumento della permeabilità del mesotelio e/o dell'endotelio capillare. Le patologie responsabili del versamento cavitario frequentemente agiscono mediante differenti meccanismi contemporaneamente; di conseguenza ad un pattern chimico e citologico di un versamento difficilmente corrisponde una determinata causa sottostante, o uno specifico agente eziologico. Pertanto l'approccio diagnostico ai versamenti cavitari, necessario a determinarne le cause sottostanti, richiede l'integrazione di diversi test strumentali (Tabella 1).¹⁻¹⁰

La classificazione dei versamenti in trasudato povero di proteine, trasudato ricco di proteine, essudato e versamento emorragico riesce a raggruppare i versamenti in modo coerente con la causa sottostante.

Laboratorio di Analisi Veterinarie La Vallonea, Via Sirtori 9,
Passirana di Rho (MI), Italy

*Corresponding Author (m.giraldi.vet@gmail.com)

Ricevuto: il 25/06/2019 - Accettato: 14/10/2019

Tabella 1
Esami complementari eseguibili sui versamenti, di supporto all'esame citologico, e relative utilità diagnostiche

Test	Esito	Patologia sottostante
Ematocrito (HCT) ^a	- HCT versamento >3% ¹ - HCT versamento >25% di HCT sangue ¹	Emorragia
Cellule totali nucleate (TNC) ^a	<3000 TNC/ μ L ²	Trasudato
	>3000 TNC/ μ L ²	Essudato
Delta TNC ^b	>1.7 ³	FIP
Proteine totali (TP) ^c	TP <2.5 g/dL ²	Trasudato povero di proteine
	TP >2.5 g/dL ²	Trasudato ricco di proteine
Colesterolo e trigliceridi ^d	- Trigliceridi >100 mg/dL ¹ - Rapporto colesterolo:trigliceridi <1 ¹	Chiloso
Urea, creatinina ^d	Rapporto creatinina versamento:creatinina sierica >2 ^f	Rottura vie urinarie
Potassio ^d	Rapporto potassio del versamento:potassio sierico >1.4 ^{4,9,h}	Rottura vie urinarie
Bilirubina ^d	Rapporto bilirubina del versamento:bilirubina sierica >1.0	Rottura vie biliari
Lipasi ^d	- Lipasi totale versamento >500U/L - Lipasi versamento >2x lipasi sierica ^{5,6} - Lipasi specifica canina del versamento >500 ug/L ⁵	Pancreatite
Lattato deidrogenasi (LDH) ^d	Rapporto LDH versamento:LDH sierico <0.5 ⁷	Trasudato
	Rapporto LDH versamento:LDH sierico >4.0 ⁷	Essudato settico
pH, pCo ₂ , glucosio, lattati ^d	- pH <7.2, pCo ₂ >55 mmHg, glucosio <50 mg/dL e lattati >5.5 mmol/L ⁸ - Lattati del versamento >2.0 mmol/L dei lattati ematici ⁹ (questo criterio non sembra essere utile nel gatto) ¹⁰ - Glucosio nel versamento < 20% del glucosio ematico ⁹	Essudato settico
Elettroforesi ^d	Tracciato elettroforetico con ipergammaglobulinemia	FIP
Prova di Rivalta ^d	Test positivo (formazione di coaguli di fibrina macroscopicamente evidenti)	FIP
Esame colturale ^e	Test positivo per crescita di microrganismi	Essudato settico

^a Su campione tal quale.

^b Parametro ottenuto attraverso il contaglobuli Sysmex® XT2000Vet. È il rapporto tra la conta di cellule nucleate (TNC) prima e dopo l'aggiunta, operata dallo strumento, di una specifica sostanza acida. I campioni ricchi di proteine e fibrinogeno, come i versamenti associati alla FIP, successivamente all'aggiunta della sostanza acida coagulano e le cellule rimangono inglobate nel coagulo di fibrina. In questi campioni quindi il rapporto tra il TNC della soluzione senza l'aggiunta della sostanza acida e il TNC della soluzione con l'aggiunta della sostanza acida (definito "delta") è più alto rispetto a di un campione senza fibrinogeno nel versamento.

^c Su surnatante se con test biochimici. Se con refrattometro, su tal quale o su surnatante.

^d Su surnatante.

^e Su campione tal quale non in EDTA.

^f In caso di precedente grave ostruzione delle vie urinarie con conseguente azotemia postrenale, il rapporto diventa <2.

^g Attendibile nelle prime ore post-rottura; con il passare del tempo il potassio viene riassorbito.

^h Potassio su versamento non attendibile se viene misurato su campione raccolto in provetta con K2EDTA/K3EDTA.

I macrofagi sono gli elementi predominanti nei trasudati; i neutrofilo possono rappresentare fino al 30% delle cellule.

CLASSIFICAZIONE

Una prima classificazione clinico-patologica del versamento si esegue attraverso la misurazione della concentrazione di proteine totali (TP) e della conta delle cellule totali nucleate (*total nucleated cell count*, TNCC). Le proteine possono essere misurate sul surnatante tramite refrattometro o con metodi di chimica clinica quali il biuretto; sebbene il refrattometro abbia un'accuratezza diagnostica accettabile,^{11,12} in caso di versamento torbido la lettura può essere difficoltosa ed è da preferire la quantificazione con metodi di chimica clinica.

La conta cellulare è accurata se eseguita con i comuni contaglobuli automatici utilizzati in ematologia.¹³⁻¹⁵ In base alla concentrazione delle proteine totali ed alla conta cellulare, i versamenti possono essere classificati in trasudati, trasudati modificati ed essudati. Questa classificazione è comparsa in letteratura veterinaria per la prima volta nel 1977¹⁶ ed è tuttora ampiamente utilizzata nella pratica veterinaria.

Nel corso del tempo sono stati proposti diversi cut-off di TP e TNCC^{1,2,17} con i quali definire le diverse categorie e ad oggi non esistono criteri definitivi e universalmente accettati.

Negli ultimi anni è stata introdotta un'ulteriore classificazione che suddivide i versamenti in trasudati ed essudati e, utilizzando il cut-off di 2.0 g/dL, sottoclassifica i trasudati in "trasudati a bassa concentrazione di proteine" e "ad alta concentrazione di proteine" (Figura 1).¹

Più recentemente sono stati proposti il cut-off di 3000 TNCC/ μ L per distinguere essudati da trasudati, ed il cut-off di 2.5 g/dL TP per distinguere i trasudati ricchi da quelli poveri di proteine (Figura 1).²

Quest'ultima classificazione, oltre ad includere alcuni versamenti altrimenti non classificabili dalle precedenti (come ad esempio alcuni versamenti con TP <2.0 g/dL e TNCC >5000/ μ L), riesce a raggruppare i versamenti in modo più coerente con la causa sottostante: per esempio, in base ai dati di un recente studio, ha permesso di includere correttamente tra gli essudati i versamenti infiammatori con TNCC compresa tra 1500 e 5000 cellule / μ L, altrimenti precedentemente inclusi tra i trasudati modificati.²

ESAME CITOLOGICO

L'esame citologico è uno step imprescindibile per la corretta interpretazione del versamento ed è ottimale se eseguito su un campione correttamente prelevato, allestito e colorato.

La valutazione citologica del campione ha come primo obiettivo l'identificazione e la descrizione sia delle cellule normalmente presenti nelle cavità, sia delle eventuali cellule infiammatorie o neoplastiche (Figura 2).

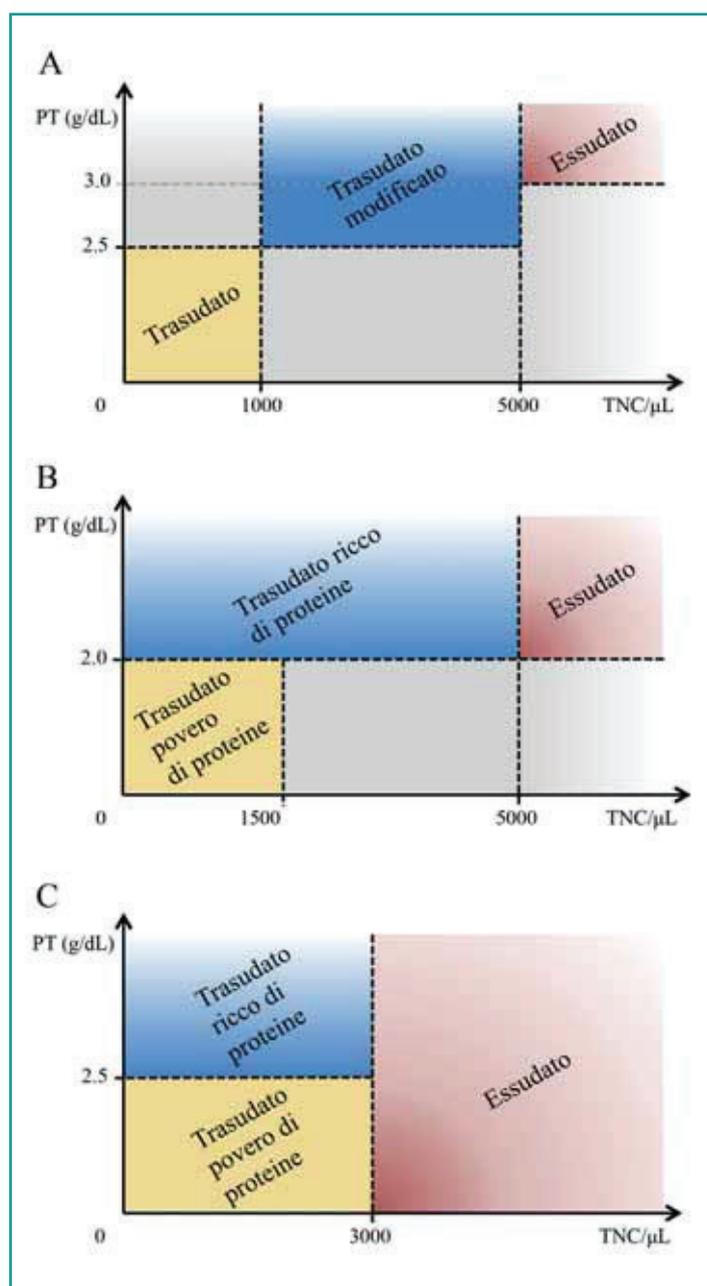


Figura 1 - Differenti classificazioni dei versamenti cavitari proposte in letteratura veterinaria basate sulle proteine totali (TP) e sulle cellule nucleate totali (TNC). **A**) Classificazione proposta da Raskin e Meyer¹⁷ con la quale vengono definiti il trasudato, trasudato modificato e l'essudato. **B**) Classificazione proposta da Stockham e Scott¹ con la quale viene introdotta la distinzione tra trasudato povero di proteine e trasudato ricco di proteine. **C**) Classificazione proposta da Bohn² con la quale, a differenza delle precedenti, vengono inclusi anche i versamenti non precedentemente classificabili, come mostrato dall'assenza di aree di colore grigio, presenti invece nelle classificazioni **A** e **B**.

Integrando la descrizione citologica con conta cellulare e misurazione delle proteine totali, il versamento può essere classificato in trasudato, essudato, versamento linforragico, emorragico o neoplastico e possono essere emesse le diagnosi differenziali delle possibili cause sottostanti (Tabella 2).

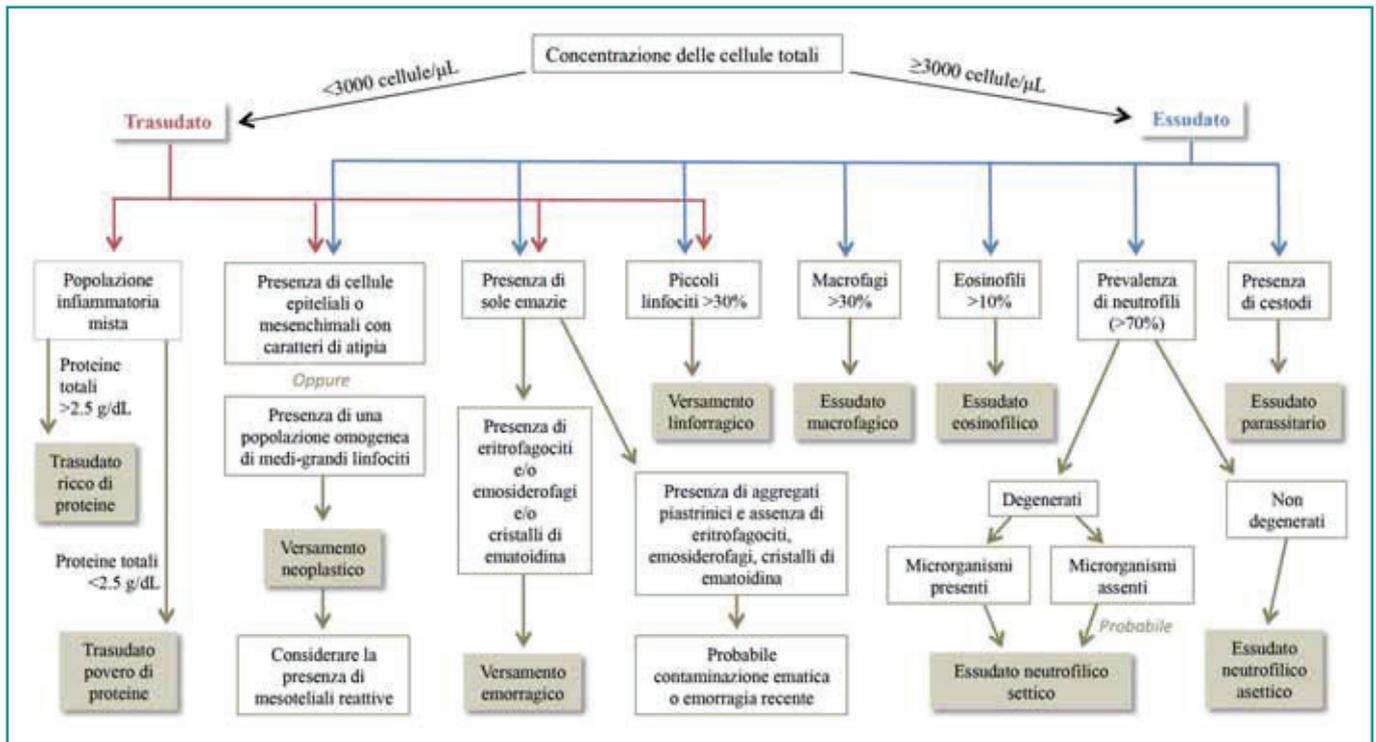


Figura 2 - Algoritmo per la valutazione citologica dei versamenti cavitari.

Tabella 2 - Diagnosi differenziali più comuni per ogni tipo di versamento

Versamento	Diagnosi differenziali
Trasudato povero di proteine	Cardiopatia (T) - Ipertensione portale presinusoidale (A) - Ipoalbuminemia
Trasudato ricco di proteine	Ipertensione portale postsinusoidale (A) - Cardiopatie Neoplasia
Essudato neutrofilico settico	Infezioni sistemiche/setticemia Migrazione corpo estraneo, migrazione parassiti Ferita da morso, precedenti ferite chirurgiche infette Perforazione esofagea (T) Progressione infezioni locali (es. discospondilite) Neoplasie con formazione di ascessi, neoplasia intestinale ulcerata Rottura/ulcerazione organi dell'apparato gastroenterico (A) Rottura vie biliari o vie urinarie che presentano concomitante infezione (A) Idiopatico
Essudato neutrofilico asettico	Pancreatite (A) - Steatite - FIP (G) - Cestodiasi Torsione d'organo - Rottura vie biliari o vie urinarie (A) - Neoplasia
Essudato macrofagico o misto macrofagico-neutrofilico	FIP (G) - Leishmania (C) - Infezioni fungine
Essudato eosinofilo	Parassitosi cardiopolmonari (T) - Polmoniti interstiziali (T) - Granulomatosi eosinofiliche Linfoma - Mastocitosi
Linforragia (versamento chiloso e non chiloso)	Cardiopatie - Tromboembolismo polmonare (T) - Infezioni Ernia diaframmatica - Traumi toracici - Neoplasie - Idiopatico
Emorragia	Coagulopatie, avvelenamento (T, P) - Neoplasie Rottura d'organo, rottura di milza (A) - Torsione d'organo - Idiopatico (P)
Versamento neoplastico	Carcinoma - Mesotelioma - Sarcoma Linfoma e altre neoplasie a cellule rotonde

T: versamento toracico; A: versamento addominale; P: versamento pericardico; C: cane; G: gatto

TRASUDATO

La popolazione cellulare tipica dei trasudati è generalmente rappresentata dagli elementi presenti fisiologicamente nelle cavità, ovvero cellule mesoteliali, macrofagi, neutrofili, scarsi linfociti ed eventuali rari eosinofili. I macrofagi (Figura 3A) sono il tipo cellulare predominante dei trasudati e, se il campione è preparato con la metodica dello striscio o striscio-linea, sono apprezzabili in maggiore quantità ai margini o al termine dello striscio. I neutrofili (Figura 3B e 3C) possono rappresentare anche oltre il 30% delle cellule nucleate del trasudato;² la loro presenza pertanto è da considerarsi normale e/o esito di lieve infiammazione dovuta a stimolazione cronica del liquido sulla parete cavitaria.¹⁷ Le cellule mesoteliali (Figura 3D) possono presentarsi singole o in piccoli aggregati (di tipo papillare o pavimentoso/monostrato) nei quali possono essere osservate le

tipiche fenestrature tra le singole cellule. La presenza del liquido in cavità può stimolare, oltre all'arrivo di neutrofili, anche la reattività delle cellule mesoteliali (Figura 4). Come descritto in seguito, nei versamenti neoplastici causati da neoplasie epiteliali, le cellule neoplastiche in esfoliazione possono presentare aspetti citologici talvolta simili alle cellule mesoteliali reattive. Scarsi piccoli linfociti (<30%) ed eosinofili (<10%) completano il quadro citologico. Infine, un certo grado di contaminazione ematica è possibile durante il prelievo mediante centesi: la presenza di aggregati piastrinici conferma l'origine iatrogena dei globuli rossi.

I trasudati "poveri di proteine" che presentano questo quadro citologico sono nella maggior parte dei casi causati da ipoalbuminemia (riduzione della pressione oncotica) secondaria a insufficienza epatica, perdita renale o perdita intestinale, e più raramente da stasi emati-

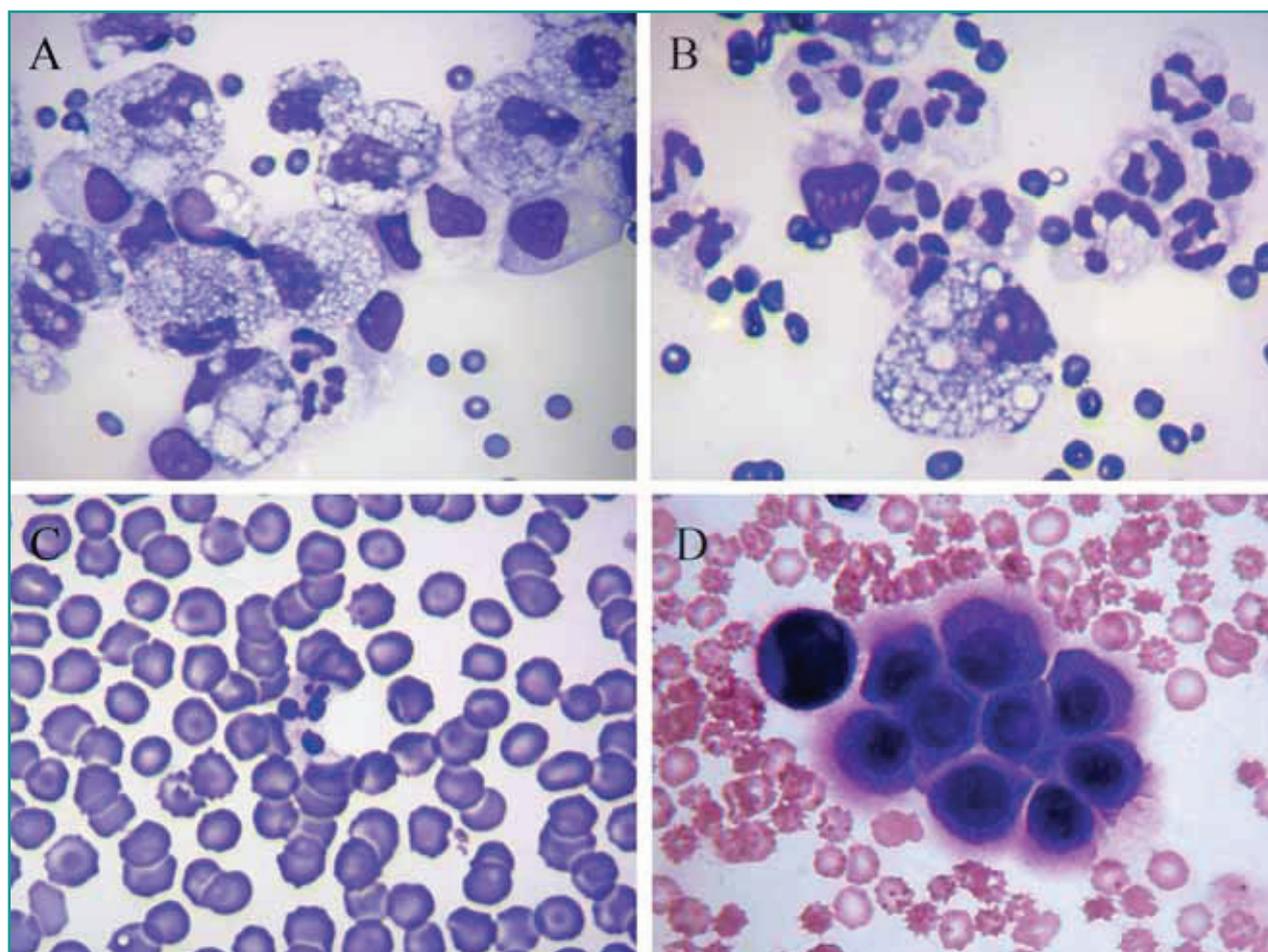


Figura 3 - Elementi cellulari caratteristici dei trasudati. **A)** I macrofagi presentano forma variabile, variabile quantità di citoplasma chiaro con frequenti vacuoli (otticamente vuoti o come materiale cellulare fagocitato) e nucleo da approssimativamente rotondo/ovale tendenzialmente periferico (colorazione di Romanowsky modificata, obiettivo 100x). **B)** I neutrofili non degenerati si presentano di forma rotonda (diametro circa 12 μm), citoplasma chiaro privo di vacuoli e nucleo segmentato (polilobato) (colorazione di Romanowsky modificata, obiettivo 100x). **C)** I neutrofili presenti nel versamento da più tempo vanno incontro a picnosi e si presentano con frammentazione del nucleo in formazioni sferiche isolate (carioressi) (colorazione di Romanowsky modificata, obiettivo 100x). **D)** Le cellule mesoteliali si presentano rotonde (generalmente di dimensione 12-30 μm , mediamente di 25 μm) con moderata quantità di citoplasma a basofilia variabile, circondate da un "orletto" eosinofilo (il glicocalice) quando esfoliate recentemente, nucleo rotondo centrale o eccentrico, cromatina finemente reticolare (colorazione di Romanowsky modificata, obiettivo 100x).

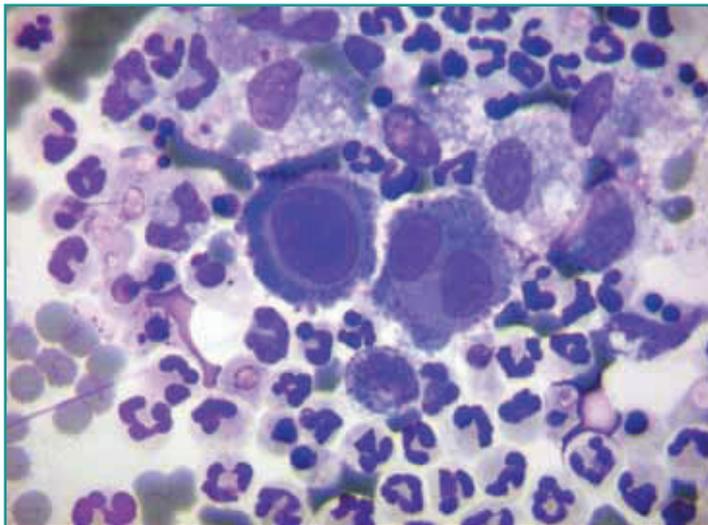


Figura 4 - Le cellule mesoteliali reattive al centro dell'immagine, circondate da numerosi elementi infiammatori, si presentano di dimensione variabile, e risultano bi-multinucleate con nuclei di dimensione variabile (anisocariosi) (colorazione di Romanowsky modificata, obiettivo 100x).

ca/linfatica per disturbi di circolo locali o sistemici (cardiopatie, masse intracavitarie) oppure, per quanto riguarda l'addome, da patologie epatiche che provocano ipertensione portale. Se sono classificati come "ricchi di proteine", solitamente sono conseguenza dell'aumento della pressione idraulica secondaria a insufficienza cardiaca / cardiopatie congestizie o disturbi di circolo locali quali neoformazioni intracavitarie o, per quanto riguarda l'addome, le epatopatie (Tabella 2)

I neutrofili degenerati, in assenza di batteri, suggeriscono la probabile natura settica dell'essudato.

ESSUDATO (VERSAMENTO DI NATURA INFIAMMATORIA)

L'essudato è il risultato della vasopermeabilizzazione indotta da un processo flogistico, attraverso il quale le cellule infiammatorie vengono richiamate nella cavità e raggiungono un'alta concentrazione (>3000 TNCC/ μ L). È la causa più comune di versamento pleurico nel cane (circa 40% secondo uno studio)¹⁸ mentre nel gatto la seconda dopo il chilotorace (circa il 25%).¹⁹

La valutazione citologica è mirata in prima istanza a classificare il versamento in base al tipo predominante di cellule infiammatorie e nel contempo a valutare la presenza/assenza di agenti patogeni.

- **Neutrofili.** Se i neutrofili sono più del 70% delle cellule, l'essudato è definito neutrofilico e suggerisce la natura acuta dell'inflammatione. È necessario valutare attentamente la morfologia dei neutrofili e distinguerli tra degenerati e non degenerati.

Degenerati. La presenza di batteri e tossine batteriche determina la peculiare trasformazione dei neutrofili in neutrofili degenerati (Figura 5A), i quali manifestano lobi nucleari più ampi e rigonfi con cromatina meno condensata e più chiara, tendente al rosa (tale morfologia del nucleo è definita cariolisi). Questo aspetto è l'esito della degenerazione idropica (dovuta all'eccessiva entrata di acqua) indotta dalle tossine batteriche sulla parete citoplasmatica e nucleare. I neutrofili degenerati devono quindi suggerire l'attenta ricerca di batteri nel campione e/o l'esecuzione dell'esame colturale del versamento. Non devono essere confusi con i neutrofili danneggiati (Figura 5B) durante l'allestimento del campione, che presentano assenza di margini citoplasmatici integri e visibili. Ai neutrofili degenerati spesso si accompagnano strie nucleari (cellule in completa rottura e degenerazione) e materiale necrotico amorfo.

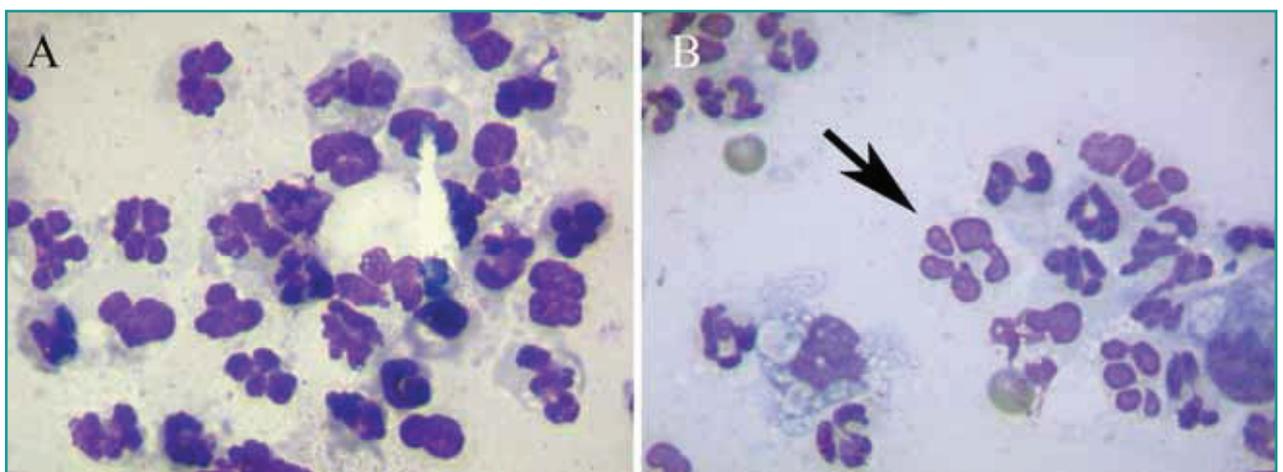


Figura 5 - Diversi aspetti citologici dei neutrofili. **A)** I neutrofili degenerati si presentano con lobi nucleari dilatati (rigonfi) per l'effetto delle tossine batteriche (colorazione di Romanowsky modificata, obiettivo 100x). **B)** I neutrofili rotti durante l'allestimento del campione (frecce) possono essere confusi con i neutrofili degenerati per l'aspetto rigonfio del nucleo ma, a differenza di questi ultimi, non sono apprezzabili i margini citoplasmatici (colorazione di Romanowsky modificata, obiettivo 100x).

Non degenerati. In assenza di tossine batteriche, i neutrofili si presentano morfologicamente simili a quelli circolanti (Figura 3B). Come descritto nei trasudati, invecchiando si possono presentare ipersegmentati, in picnosi e fagocitati dai macrofagi. La loro presenza suggerisce la natura asettica del versamento.

- **Macrofagi**. La presenza di macrofagi (Figura 3A) è significativa quando il loro numero supera il 30% delle cellule e suggerisce la natura cronica dell'essudato. La prevalenza assoluta di macrofagi (>50%) è un quadro infrequente mentre è più comune un pattern misto neutrofilico-macrofagico. Possono presentarsi con citoplasma vacuolizzato, nei cui vacuoli possono essere visibili cellule/nuclei in apoptosi, eritrociti, emosiderina, ematoidina, gocce lipidiche e agenti infettivi.

- **Eosinofili**. Quando gli eosinofili sono oltre il 10% delle cellule nucleate, il versamento è eosinofilo.²⁰ Questo tipo di versamento è poco comune nel cane e nel gatto ed è associato a neoplasie (linfoma e mastocitosi sistemica), parassitosi cardiopolmonari ed intestinali, polmoniti interstiziali, pneumotorace, torsione del lobo polmonare e granulomatosi eosinofile.²⁰

- **Linfociti**. Essudati infiammatori con predominanza di linfociti non sono riportati in letteratura veterinaria ma in medicina umana sono associati a tubercolosi.²¹ Un secondo ma non meno importante obiettivo dell'esame citologico negli essudati è la ricerca di microrganismi o parassiti.

- **Cocchi e bastoncelli**. I cocci (Figura 6A) sono visibili come corpi sferici bluastrici di 1-2 μm ¹⁷ che si presentano isolati, in coppie, in aggregati di 4-12 elementi (tipicamente *Staphylococcus*) o in piccole catenelle (*Streptococcus*). I bastoncelli sono di aspetto fusiforme (1x3 μm) e si presentano singoli o in coppia (Figura 6B). I più frequenti sono rappresentati da *Escherichia coli* e *Pasteurella spp.*¹⁷ È importante identificare la presenza dei bat-

La presenza di occasionali batteri in ambiente esclusivamente extracellulare, in assenza di neutrofili degenerati, può essere indicativa di contaminazione del campione durante il prelievo o la sua conservazione.

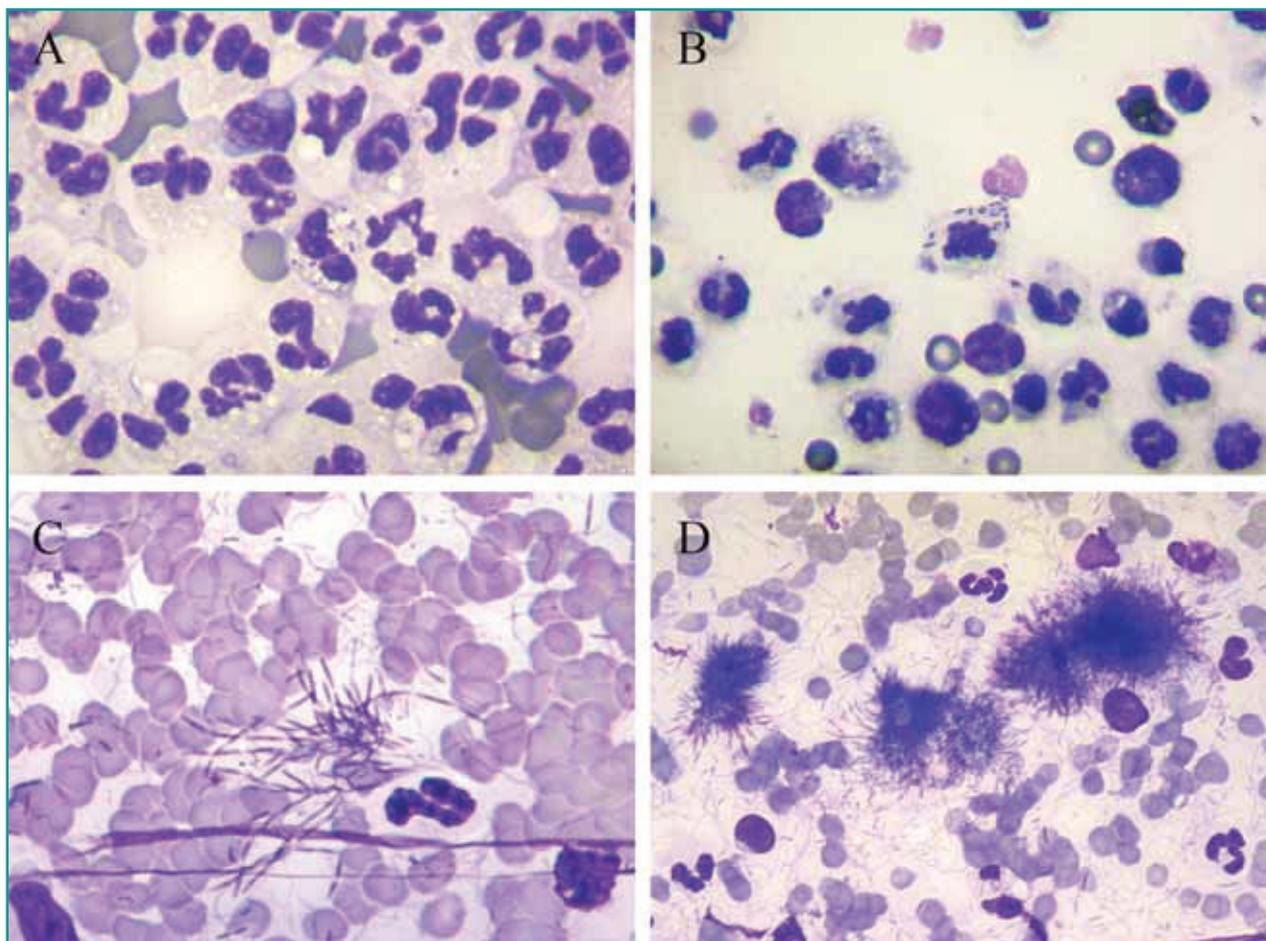


Figura 6 - A) Batteri coccacei nel citoplasma di un neutrofilo (colorazione di Romanowsky modificata, obiettivo 100x). **B)** Batteri di aspetto bastoncellare nel citoplasma di due neutrofili (colorazione di Romanowsky modificata, obiettivo 100x). **C)** Numerosi batteri filamentososi (colorazione di Romanowsky modificata, obiettivo 100x). **D)** Agglomerati di filamenti (di *Nocardia* o *Actinomyces*) denominati *sulfur granules* (colorazione di Romanowsky modificata, obiettivo 40x).

teri in ambiente intracellulare dei neutrofilo: la sola presenza extracellulare infatti, (soprattutto se cocchi e se i neutrofilo non sono degenerati) può essere indicativa di contaminazione, ad esempio per attraversamento della cute con l'ago durante il campionamento; questa falsa positività può verificarsi con maggior probabilità nel caso in cui il preparato citologico venga allestito successivamente al prelievo (alcune ore dopo) strisciando dal versamento raccolto in provetta, poiché con il passare del tempo i batteri contaminanti campione tendono a replicarsi all'interno del campione. La presenza di una popolazione mista di batteri in un essudato settico peritoneale suggerisce la rottura della parete intestinale.

- **Micobatteri.** I micobatteri possono essere visibili nei macrofagi del versamento associato a infezione sistemica. Quando il campione è colorato con le comuni colorazioni di tipo Romanowsky, sono visibili come bastoncelli bianchi sul fondo bluastro del citoplasma dei macrofagi, per la loro incapacità di assorbire queste colorazioni. La loro presenza deve quindi essere confermata con la colorazione di Ziehl-Neelsen, la quale evidenzia i micobatteri di colore rosso su di uno sfondo blu pallido.

- **Batteri filamentosi.** I batteri dei generi *Nocardia* e *Actinomyces* (Figura 6C) sono anaerobi e si presentano in lunghi filamenti di colore blu pallido con piccole aree rosa-viola intermittenti che danno un aspetto a corona di perle al filamento. Possono formare i tipici *sulfur granules*, che costituiscono le colonie batteriche e che citologicamente

si presentano come agglomerati di filamenti di colore blu intenso (Figura 6D). I neutrofilo presenti sono prevalentemente non degenerati e solo nelle vicinanze dei *sulfur granules* assumono l'aspetto degenerato.¹⁷ Sono associati a migrazione di corpi estranei, perforazioni esofagee²² e, come descritto in alcuni *case report*, a neoplasie sistemiche²³ o locali (come i carcinomi) per l'immunodepressione o la riduzione della tensione di ossigeno localizzata nel tessuto neoplastico.²⁴

- **Protozoi.** La presenza di toxoplasma²⁵ e leishmania²⁶ nei macrofagi del versamento è segnalata infrequentemente in letteratura veterinaria in corso di infezione sistemica.

- **Criptococco.** I criptococchi, presenti nei versamenti associati a infezioni sistemiche,^{27,28} sono visibili come corpi sferici di 4-10 µm con capsula lipidica chiara (non colorata con le colorazioni di tipo Romanowsky) sia liberi che nel citoplasma dei macrofagi.

- **Cestodiasi.** Le infestazioni peritoneali delle larve di parassiti del genere *Mesocestoides* esitano in un versamento che macroscopicamente appare biancastro flocculoso (Video). All'esame citologico sono visibili le tipiche strutture tridimensionali di materiale amorfo azzurro (frammenti di parassita) (Figura 7A) contenenti formazioni tondeggianti/ovalifrangenti chiamati "corpuscoli calcifici" (Figura 7B).^{29,30}

Sono stati studiati diversi parametri biochimici per differenziare gli essudati settici dagli asettici (Tabella 1) ma,

Il versamento biliare presenta caratteristiche citologiche peculiari che ne permettono la corretta diagnosi e che devono essere sempre supportate dall'esame biochimico del versamento.



Video
Aspetto macroscopico del versamento addominale secondario a cestodiasi.
<https://www.scivac.it/it/v/17640/1>

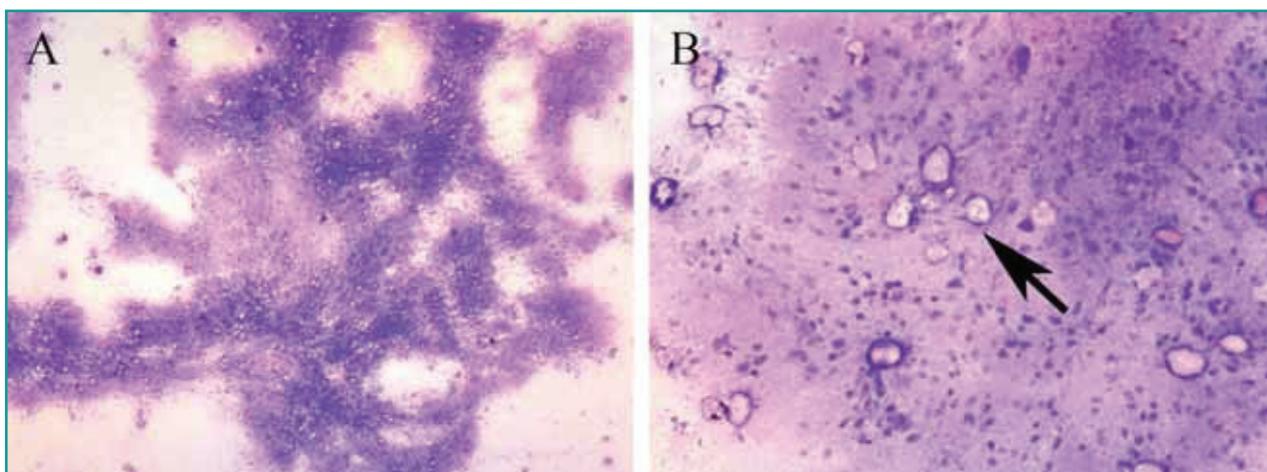


Figura 7 - Versamento secondario a infestazione da *Mesocystoides* spp. **A)** Voluminose zolle di materiale amorfo corrispondente a frammenti di parassita in via di degenerazione (colorazione di Romanowsky modificata, obiettivo 10x). **B)** Numerose strutture chiare e non colorate, tridimensionali, che vengono definite corpuscoli calcifici (indicati con la freccia) (colorazione di Romanowsky modificata, obiettivo 10x).

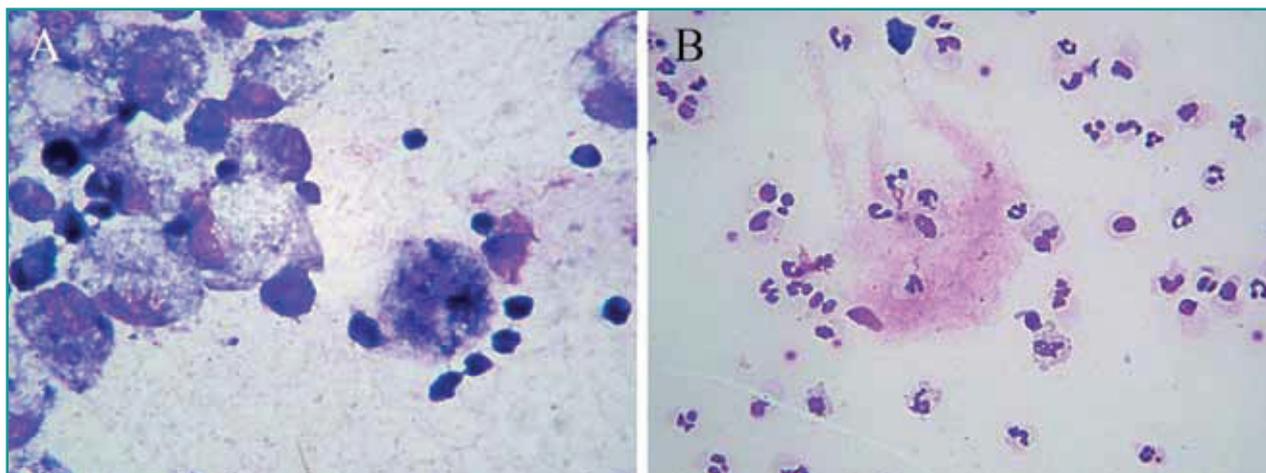


Figura 8 - Versamento biliare. **A)** Materiale biliare nel citoplasma di alcuni macrofagi (colorazione di Romanowsky modificata, obiettivo 100x). **B)** Materiale amorfo mucoproteico presente in ambiente extracellulare (colorazione di Romanowsky modificata, obiettivo 40x). Gentile concessione del Dott. W. Bertazzolo.

fatta eccezione per l'esame colturale che resta il gold standard, l'esame citologico rimane ancora il test più

indicato per tale discriminazione.³¹

È importante ricordare che la predominanza di cellule infiammatorie (anche associata alla presenza di batteri) non esclude necessariamente la natura neoplastica del versamento ed è necessario fare attenzione alla presenza e all'aspetto delle cellule di tipo non infiammatorio presenti nel campione. È possibile infatti che la neoplasia possa essere la causa di infiammazione asettica associata ad aree di necrosi, oppure essere la causa di infiammazione settica nel caso in cui, per esempio, coinvolga l'apparato intestinale e sia presente ulcerazione e rottura della parete.

Alcuni essudati sono esito di specifici eventi patologici che possono presentare caratteristiche citologiche peculiari. Vediamo alcuni esempi specifici.

Versamento biliare

La bile è estremamente irritante per la superficie sierosa e provoca rapidamente richiamo di cellule infiammatorie. Le effusioni cavarie possono essere sia asettiche che settiche e sono conseguenti a fuoriuscita della bile da cistifellea o coledoco (in peritoneo ma eventualmente anche nelle cavità pleuriche o pericardica in caso di ernie diaframmatiche),³² rottura del parenchima epatico o torsione di un lobo epatico.

Le caratteristiche citologiche tipiche del versamento biliare sono:

- presenza di bile sul fondo, visibile come agglomerati di materiale amorfo granulare, di colore da giallo a verdastro-bluastro scuro.

Nei versamenti emorragici, gli eritrofagociti, gli emosiderofagi e i cristalli di ematoidina sono utili per stimare la durata dell'emorragia.

li, macrofagi e cellule mesoteliali (Figura 8A). Questo prende forma romboidale/amorfa color oro con aspetto simile a ematoidina (vedi oltre).

- materiale mucoso (secreto dalle cellule di cistifellea e coledoco) che appare come ampie aree extracellulari di colore blu-grigio (Figura 8B).

Uroperitoneo

Anche l'urina, come la bile, è irritante per le cellule della cavità peritoneale e pertanto, citologicamente, predomina un quadro da essudato flogistico nel caso di rottura delle vie urinarie, che si presenta solitamente asettico ma può presentarsi settico in caso di infezione delle vie urinarie. Solo nelle prime fasi della rottura dell'organo l'urina può essere povera di cellule al punto da presentare concentrazione di cellule e proteine da trasudato. La presenza di cristalli urinari (estremamente infrequente) permette di identificare questo tipo di versamento alla citologia ma, qualora non siano presenti, è l'esame biochimico del surnatante che consente di emettere la diagnosi (Tabella 1).

Peritonite infettiva felina (FIP)

L'approccio diagnostico alla FIP è notoriamente complesso e richiede l'integrazione di segni clinici e differenti test di laboratorio, tra cui l'istologia e l'immunoistochimica sugli organi coinvolti per raggiungere la diagnosi definitiva.³³ L'esame del versamento associato a FIP (nella forma effusiva) non è pertanto sufficiente a confermarne la diagnosi ma, citologicamente, è caratterizzato

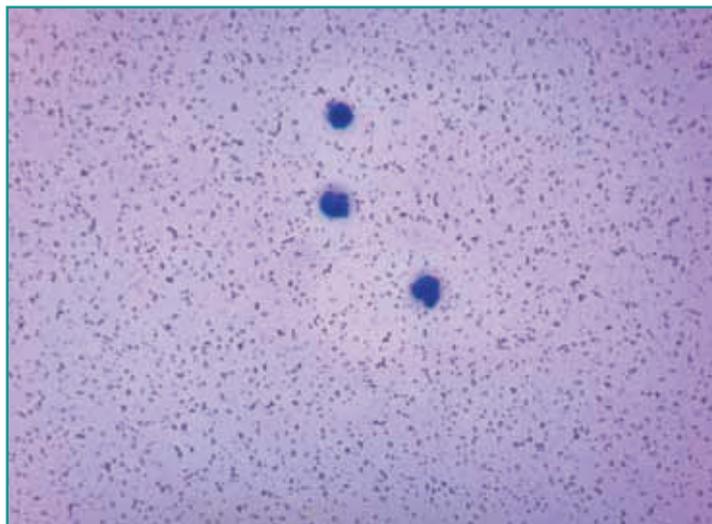


Figura 9 - Versamento associato a peritonite infettiva felina (FIP). Il fondo è bluastro ed è presente abbondante materiale corpuscolato basofilo per l'elevata concentrazione di proteine nel campione, oltre a rari leucociti coartati e poco riconoscibili (colorazione di Romanowsky modificata, obiettivo 40x).

da un fondo bluastro-violaceo intenso (Figura 9) ed un quadro neutrofilico o misto neutrofilico-macrofagico, raramente linfocitico.¹⁷ Sul versamento è possibile eseguire ulteriori esami di laboratorio utili a supportare la diagnosi di FIP (Tabella 1).

EMORRAGICO

Dal punto di vista clinico-patologico il versamento emorragico è caratterizzato da un ematocrito di almeno 3%¹ o di almeno il 25% di quello del sangue periferico.³⁴ Le cause più frequenti sono le coagulopatie, la rottura o la torsione d'organo, i traumi, la pericardite idiopatica e le neoplasie. La sede della raccolta emorragica può suggerire le eziologie più probabili: versamenti in cavità toracica sono più frequenti in corso di coagulopatie, torsioni, traumi e neoplasie; versamenti pericardici sono spesso associati a coagulopatie e neoplasie, mentre quelli addominali, a torsioni e rotture d'organo (soprattutto a carico della milza) e neoplasie.

Circa un quarto dei versamenti toracici del gatto sono secondari a neoplasie intratoraciche e di questi più della metà sono linfomi.

Nonostante il versamento emorragico sia già identificabile all'esame macroscopico per il colore da sieroso-ematico (rosato) a ematico, la valutazione citologica è importante per diversi motivi. In primo luogo per valutare se la presenza di sangue sia secondaria a contaminazione durante il prelievo (per traumatismi della parete intestinale o di un organo interno) o a reale emorragia:

Piastrine. La presenza di piastrine sia libere che, soprattutto, in aggregati suggerisce la natura iatrogena o l'emorragia recente (Figura 10A).

Precursori eritroidi. Nei (rari) casi in cui sia accidentalmente campionata la milza durante la centesi addominale e il campione sia pertanto contaminato da sangue splenico, la presenza di precursori eritroidi nel versamento ma assenti nel sangue periferico conferma l'origine splenica delle emazie. Tuttavia, la presenza di precursori eritroidi è stata descritta anche in caso di versamento emorragico associato ad intensa ematopoiesi extramidollare³⁵ e, pertanto, la loro identificazione deve porre in diagnosi differenziale questo evento patologico, seppur raro.

L'esame citologico inoltre permette di evidenziare alcuni segni che, se presenti, possono aiutare a stimare da quanto tempo il sangue è presente in cavità.

Eritrofagociti (Figura 10B). Macrofagi con eritrociti fagocitati; confermano la reale presenza di sangue nel versamento.

Emosiderofagi (Figura 10C). Con il passare del tempo gli eritrofagociti iniziano a degradare gli eritrociti e la digestione dei loro gruppi eme determina l'accumulo di emosiderina nei fagosomi. Citologicamente sono caratterizzati dalla presenza di granuli verdastri/bluastri, se colorati con le colorazioni di tipo Romanowsky. La presenza degli emosiderofagi suggerisce che l'emorragia è presente da almeno due giorni, mentre la loro assenza e la presenza dei soli eritrofagociti suggerisce la natura recente (da poche ore a circa due giorni). Anche gli emosiderofagi escludono la natura iatrogena dell'emorragia.

Cristalli di ematoidina. La degradazione anaerobica dell'emoglobina, attraverso un processo chimico che richiede alcuni giorni, esita nella formazione di cristalli color giallo oro di forma romboidale, visibili sia in sede extracellulare che intracellulare di macrofagi e cellule mesoteliali (Figura 10D). La loro presenza suggerisce quindi la cronicità dell'emorragia.

Cellule mesoteliali reattive. Con il cronicizzarsi dell'emorragia, è normale rilevare la presenza di cellule mesoteliali reattive che possono essere presenti in quantità variabile.

La reattività e la quantità delle cellule mesoteliali sono particolarmente marcate nei versamenti emorragici pericardici.

È interessante sottolineare che, sebbene non direttamente dimostrato, il continuo stimolo infiammatorio provocato dall'emorragia cronica sembra essere un fattore predisponente di mesotelioma.³⁶

Infine, il versamento emorragico può essere l'esito secondario di infezioni e neoplasie: riveste quindi particolare importanza la valutazione citologica alla ricerca di agenti eziologici o cellule neoplastiche.

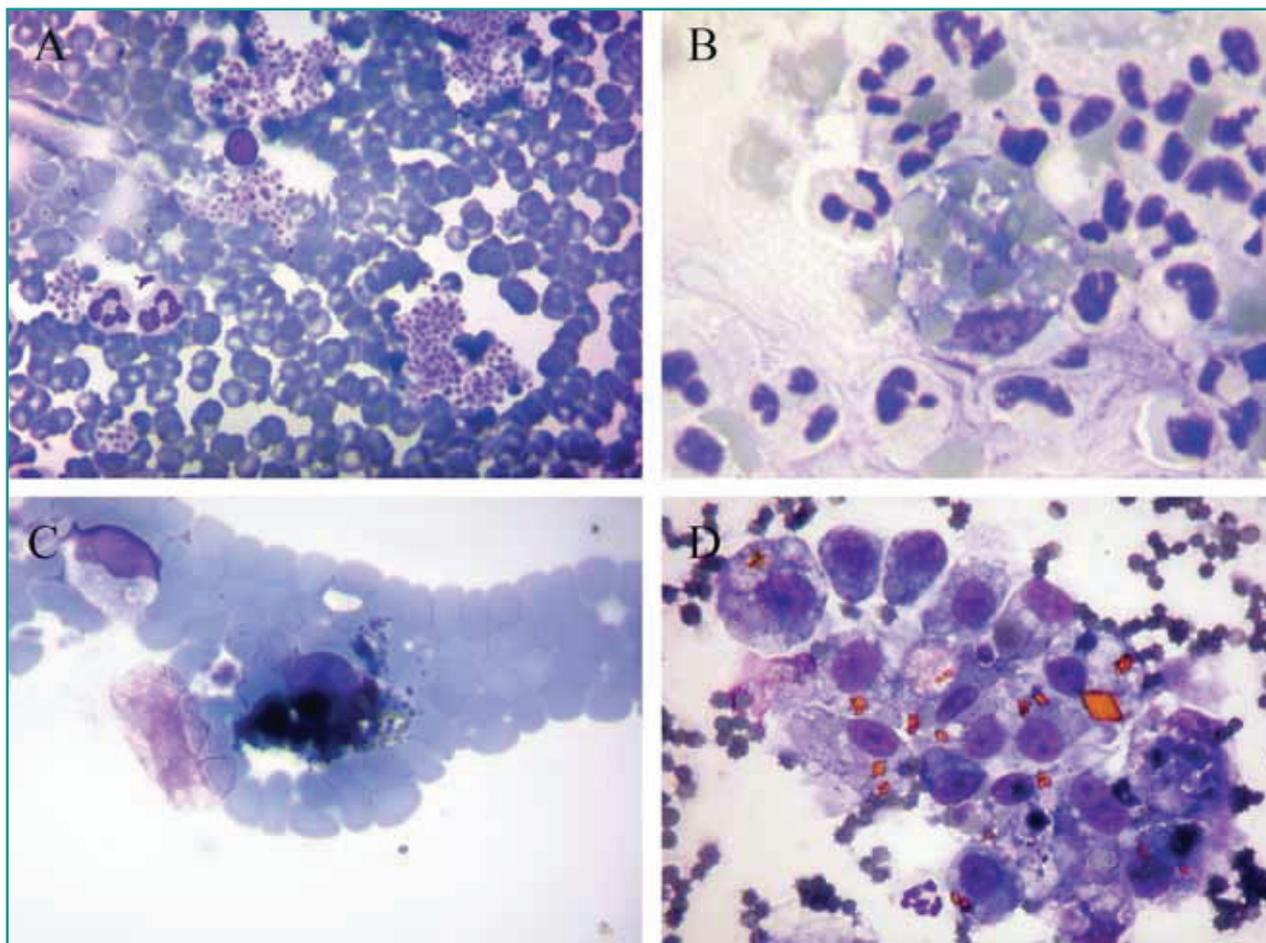


Figura 10 - A) Aggregato piastrinico. La presenza di aggregati piastrinici suggerisce l'origine iatrogena del sangue nel versamento, da confermare con ulteriori indagini di laboratorio (ad esempio la misurazione dell'ematocrito del versamento) e di diagnostica per immagini (colorazione di Romanowsky modificata, obiettivo 40x). **B)** Eritrofagocita. Gli eritrofagociti sono macrofagi nel cui citoplasma sono presenti eritrociti a seguito di fagocitosi (colorazione di Romanowsky modificata, obiettivo 100x). **C)** Emosiderofago. Gli emosiderofagi costituiscono l'evoluzione degli eritrofagociti; in seguito alla degradazione dell'emoglobina, si formano i tipici granuli bluastri-nerastri nel citoplasma (emosiderina) (colorazione di Romanowsky modificata, obiettivo 100x). **D)** Cristalli di ematoidina nel citoplasma di alcuni macrofagi. Sono corpi di forma romboidale di color giallo-oro che si presentano in sede extracellulare o intracellulare dei macrofagi; rappresentano l'esito della degradazione anaerobia dell'emoglobina (colorazione di Romanowsky modificata, obiettivo 40x).

LINFORRAGIA

Il versamento linforragico è caratterizzato dalla predominanza di piccoli linfociti che sono associati a tutte le patologie che esitano nella fuoriuscita di linfa dai vasi linfatici, per loro rottura o per blocco del drenaggio linfatico, come nel caso di traumi toracici, stasi secondarie a cardiopatie congestizie o a masse intracavitarie. Poiché in molte situazioni patologiche, l'esatta origine e natura dei linfociti di questo versamento non sono sempre chiari, è stato suggerito da alcuni autori l'utilizzo del termine "trasudato ricco di linfociti" (*lymphocyte-rich transudate*).³⁷ A seconda del tipo di vaso linfatico interessato, questi versamenti possono essere classificati in chilosi o non chilosi (Tabella 2). Il versamento chiloso origina dai vasi linfatici drenanti il piccolo intestino e presenta macroscopicamente un grado variabile di lattescenza per la presenza di chilomicroni; il rapporto colesterolo:trigliceridi <1 o i trigliceridi >100 mg/dL sono caratteristici di

questo versamento (Tabella 1). Il versamento non chiloso origina dai vasi linfatici non drenanti il piccolo intestino oppure da quelli drenanti il piccolo intestino nel caso in cui i lipidi siano assenti/scarsi nella dieta o siano rapidamente rimossi dai macrofagi.

Rappresentano circa il 5-30% dei versamenti pleurici del gatto,^{19,38} mentre sono rari in sede addominale e pericardica.³⁹⁻⁴²

Il versamento linforragico (chiloso e non chiloso) si può presentare come trasudato o essudato e citologicamente è caratterizzato dalla predominanza di linfociti (>50%), tra i quali sono particolarmente rappresentati gli elementi di piccole dimensioni (Figura 11) con una percentuale variabile, ma non predominante, di medi linfociti.¹ Per il continuo stimolo irritante del versamento sulla parete cavitaria e/o per concomitanti differenti meccanismi patologici alla base del versamento, la percentuale di linfociti può essere inferiore ma generalmente

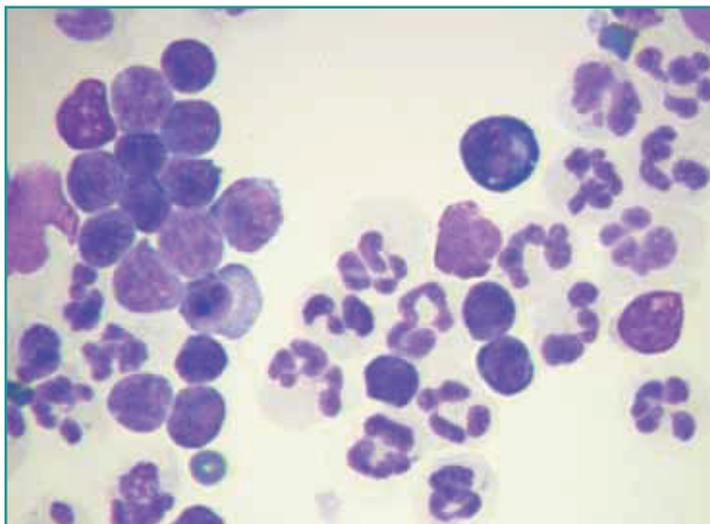


Figura 11 - Versamento linforragico. I piccoli linfociti sono l'elemento cellulare predominante dei versamenti linforragici e presentano un nucleo di diametro non superiore a 1,5 volte il diametro di un eritrocita e caratterizzano il versamento linforragico. Generalmente la loro percentuale è >50% delle cellule ma in caso di stimolazione infiammatoria cronica del versamento sulla parete toracica, la percentuale può ridursi per la consistente presenza di neutrofili, come nel campione qui illustrato (colorazione di Romanowsky modificata, obiettivo 100x).

rimane superiore a 30%² e possono essere presenti di conseguenza anche macrofagi, variabilmente vacuolizzati con vacuoli otticamente vuoti per la presenza di lipidi, e neutrofili non degenerati, oltre a cellule mesoteliali reattive.⁴² Non è infrequente inoltre rilevare una piccola percentuale di granulociti eosinofili. Nel caso del versamento linforragico chilososo, sono infine visibili gocce lipidiche sul fondo del campione.

La maggior parte dei versamenti secondari a linfoma presenta cellule di medie o grandi dimensioni, facilmente distinguibili dai normali piccoli linfociti.

NEOPLASTICO

Circa la metà (57%) dei versamenti pericardici e 11% dei versamenti addominali e pleurici del cane sono associati a neoplasie.²⁰ Nel gatto, circa un quarto (25,8%) delle effusioni pleuriche sono associate a neoplasie primarie o metastatiche intratoraciche.⁴³

I meccanismi alla base dei versamenti secondari a processi neoplastici possono essere diversi e concomitanti: stasi linfatica dovuta all'infiltrazione delle cellule neoplastiche in organi prossimi alle cavità (es linfonodi mediastinici, fegato, milza, ecc.), esfoliazione diretta di cellule neoplastiche nel lume cavitario, trasudazione causata da compressione sui vasi, rottura di vasi sanguigni con conseguente emorragia, infiammazione locale e di-

sturbi dell'emostasi. In generale, la sensibilità della citologia del versamento per la diagnosi di neoplasia è di circa 61-64%, mentre la specificità è prossima al 100%.⁴⁴ La sensibilità è bassa per diversi fattori, tra cui i principali risiedono nella naturale ridotta propensione a esfoliare cellule da parte di alcune neoplasie (in primis i sarcomi) e l'interferenza del sangue nell'identificare le cellule neoplastiche tanto che, per i versamenti pericardici, è stato descritto un aumento dell'accuratezza diagnostica dal 7 al 20% in caso di ematocrito del versamento inferiore al 10%.⁴⁵

Linfoma

I linfomi sono causa del 13-17% dei versamenti toracici nel gatto^{19,43} e del 6% nel cane.¹⁸ Si presentano più frequentemente in torace poiché sono usualmente secondari a linfomi mediastinici.

I versamenti addominali compaiono nel 10% dei linfomi LGL felini: questa complicanza, sebbene sia motivo di riduzione della qualità della vita, non sembra essere associata ad una più rapida progressione della neoplasia o ad un aumento del rischio di decesso.⁴⁶ Seppur rari, tutti i casi descritti di linfoma con coinvolgimento primario o secondario di miocardio o pericardio esitano in versamento pericardico.⁴⁷⁻⁴⁹

I versamenti secondari a linfoma sono caratterizzati dall'esfoliazione di linfociti neoplastici dagli organi prossimi alle cavità come linfonodi, fegato, milza, polmoni e timo. Tali elementi neoplastici generalmente mantengono gli aspetti morfologici evidenziabili nella sede primaria: pertanto, la loro descrizione citologica è importante per classificare il linfoma in "basso grado" ed "alto grado", sebbene sia sempre consigliato il campionamento anche degli organi primari coinvolti. In generale, i linfomi di basso grado si presentano con elementi di piccole dimensioni e con basso indice mitotico, mentre, al contrario, i linfomi di alto grado tendono a presentarsi con elementi di medie-grandi dimensioni e con alto indice mitotico (Figura 12).

È importante notare che, talvolta, può essere difficoltoso differenziare tra un linfoma di basso grado a piccole cellule e un versamento linforragico non neoplastico: in questi casi sono necessari l'immunocitochimica,⁵⁰ la citofluorimetria sul versamento,⁵¹ il test di clonalità linfoide (PARR, *polymerase chain reaction amplification for antigen receptor rearrangement*)⁵² e l'esame istologico della lesione primaria per confermare la diagnosi.

Tuttavia, la maggior parte dei linfomi del cane e del gatto si presenta con elementi neoplastici di dimensioni medie (diametro del nucleo compreso tra 2 e 2,5 volte il diametro di un eritrocita) o grandi dimensioni (diametro del nucleo superiore a 3 volte il diametro di un eritrocita)^{53,54} e pertanto, le cellule linfomatose eventualmente presenti nel versamento sono facilmente riconoscibili e ben di-

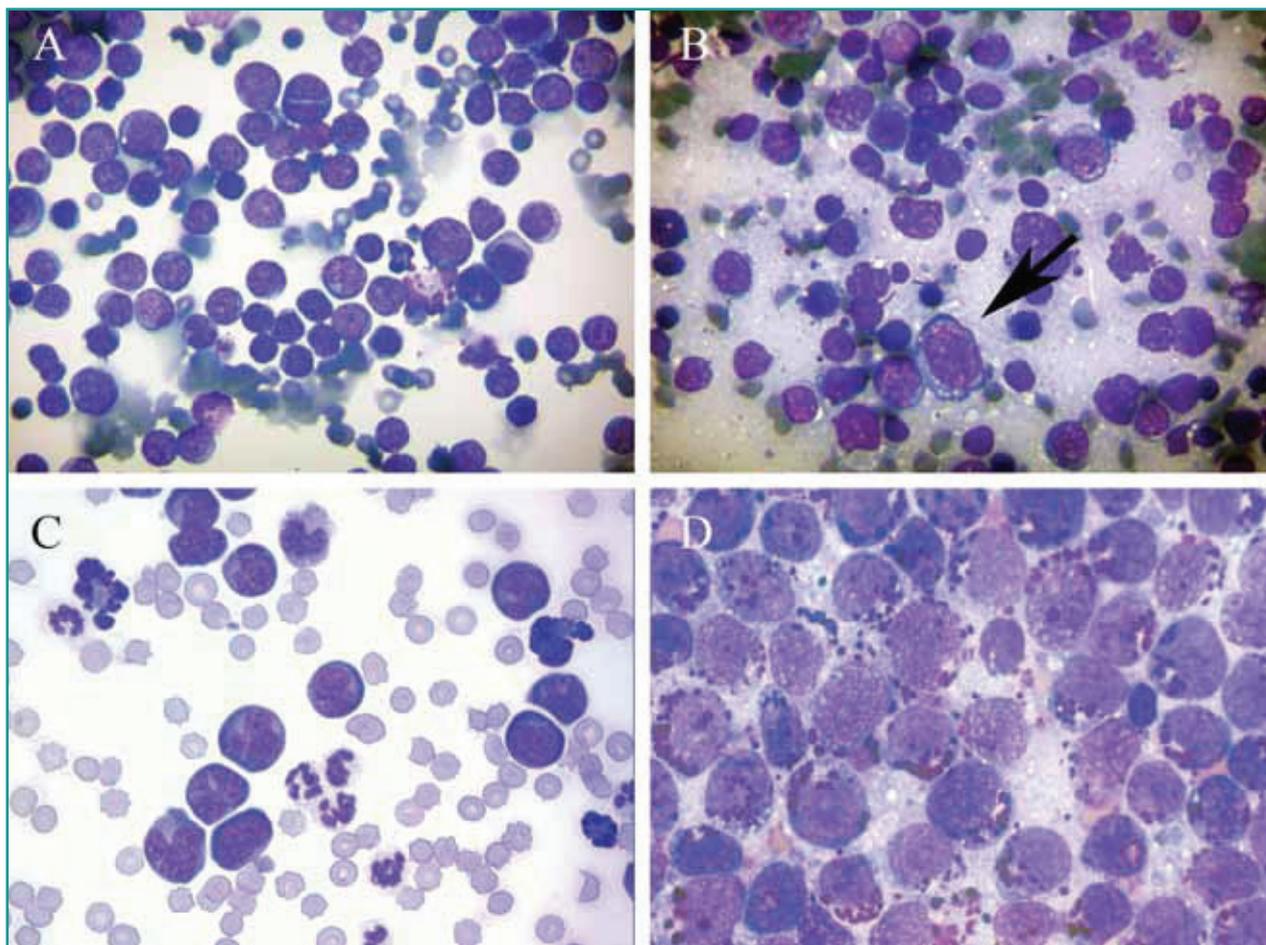


Figura 12 - Differenti quadri citologici dei versamenti secondari a linfoma. **A)** Elementi linfoidi di medie dimensioni (colorazione di Romanowsky modificata, obiettivo 40x). **B)** Popolazione di elementi linfoidi che si presenta mista di piccoli linfociti e medio-grandi linfoblasti (indicati con la freccia). La presenza di numerosi linfoblasti, nonostante non siano l'elemento predominante, pone il sospetto di linfoma di alto grado, con possibile linforragia secondaria a stasi linfatica (colorazione di Romanowsky modificata, obiettivo 40x). **C)** Elementi linfoidi neoplastici di medie dimensioni i cui nuclei si presentano pleomorfi e convoluti (colorazione di Romanowsky modificata, obiettivo 40x). **D)** Linfoma *large granular lymphocyte* (LGL); i linfociti dei linfomi LGL presentano granuli color rosa/magenta nel citoplasma, spesso polarizzati ad un polo cellulare (colorazione di Romanowsky modificata, obiettivo 100x).

La differenziazione tra cellule epiteliali neoplastiche e cellule mesoteliali reattive può essere talvolta difficoltosa o impossibile in assenza di marcate atipie citologiche.

stinte dai normali piccoli linfociti che caratterizzano un quadro linforragico. È possibile inoltre che la stasi linfatica secondaria all'infiltrazione di cellule linfomatose (di medie-grandi dimensioni) generi un quadro misto: in questo caso si manifesta una commistione di linfociti di piccole dimensioni e medio-grandi, che mimano una reattività linfocitica; anche in questo caso è necessario il supporto di ulteriori esami di laboratorio e/o di diagnostica per immagini.

Altre neoplasie a cellule rotonde

In letteratura veterinaria sono riportati casi di versamento associato a sarcoma istiocitico,⁵⁵ mastocitoma,^{56,57}

plasmocitoma,^{58,59} nell'ambito di una evoluzione sistemica di queste patologie. Anche per queste neoplasie, le caratteristiche citologiche degli elementi neoplastici eventualmente presenti nel versamento sono sovrapponibili alle caratteristiche morfologiche peculiari delle neoplasie primarie (Tabella 3 e Figura 13)⁵⁸⁻⁶³ e pertanto la loro descrizione permette di raggiungere la diagnosi. Quando si presentano di aspetto meno differenziato, con l'esame citologico è possibile emettere una diagnosi generica di neoplasia a cellule rotonde ed è necessario procedere con l'immunocitochimica o l'esame istopatologico/ immunocistochemico per la diagnosi definitiva.

Tabella 3 - Tumori a cellule rotonde		
	Aspetti citologici	Immunocitochimica
Linfoma ¹⁷	Forma rotonda, scarso citoplasma blu, nucleo rotondo talvolta indentato o irregolare; presenza di corpi linfoghiandolari	CD3 ⁺ a CD5 ⁺ a CD20 ⁺ b CD79a ⁺ b
Sarcoma istiocitico ^{55,60-63}	Forma da rotonda a fusiforme o pleomorfa, abbondante citoplasma blu con possibili vacuolizzazioni, nuclei rotondi talvolta indentati, con uno o più nucleoli; possibili cellule multinucleate; anisocitosi e anisocariosi e atipie citologiche generalmente marcate. La variante emofagocitica presenta eritrociti in sede citoplasmatica	CD1a ⁺ CD11c ⁺ c CD11d ⁺ c CD18 ⁺ CD240 ⁺
Plasmocitoma ^{58,59}	Forma rotonda, nuclei rotondi-ovals spesso eccentrici; cromatina moderatamente coartata con nucleoli indistinti; frequenti binucleazioni; anisocitosi e anisocariosi generalmente marcate	MUM-1 ⁺
Mastocitoma ^{17,56,57}	Forma rotonda, citoplasma blu chiaro con variabile quantità di granuli. Atipie citologiche variabili in funzione del grado	C-Kit ⁺ Tryptase ⁺

^a Valido per linfoma T
^b Valido per linfoma B
^c Valido per la variante emofagocitica del cane

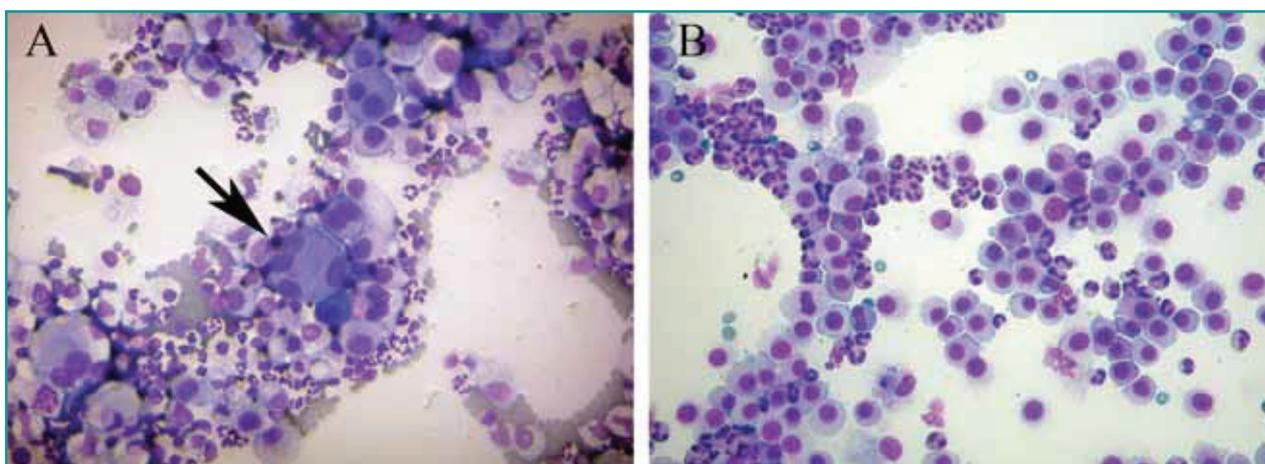


Figura 13 - A) Sarcoma istiocitico. La presenza di cellule rotonde, talvolta multinucleate (indicate con la freccia) con marcati caratteri di atipia pone il sospetto di neoplasia maligna istiocitaria (colorazione di Romanowsky modificata, obiettivo 10x). **B)** Mastocitoma. Sono presenti cellule rotonde con citoplasma blu chiaro nel cui citoplasma sono presenti granuli color magenta. Note la presenza di numerosi eosinofili che spesso accompagnano i mastociti neoplastici (colorazione di Romanowsky modificata, obiettivo 10x).

Carcinoma

I carcinomi primari degli organi intracavitari o le metastasi di carcinomi di altre sedi sono la causa più comune di versamento pleurico e peritoneale nel cane²⁰ mentre nel gatto sono la prima causa del versamento addominale e tra le prime cause di versamento toracico (circa 10%).^{20,43} Circa il 30% dei carcinomi toracici del gatto presenta versamento alla diagnosi, all'interno del quale sono presenti cellule neoplastiche in percentuale variabile (circa dal 10 al 90% dei casi).⁶⁴

Le caratteristiche citologiche comuni a tutte le cellule epiteliali, comprese le cellule neoplastiche, sono: forma variabilmente rotonda (e/o poligonali o angolari) con margini citoplasmatici distinti, stretta adesione tra gli elementi cellulari (per la presenza di desmosomi) a formare aggregati, nuclei tendenzialmente rotondi.²⁰ (Figura 14). La trasformazione carcinomatosa delle cellule determina la presenza di ulteriori caratteristiche morfologiche atipiche che sono facilmente apprezzabili all'esame citologico (Tabella 4). L'identificazione della sede primaria del-

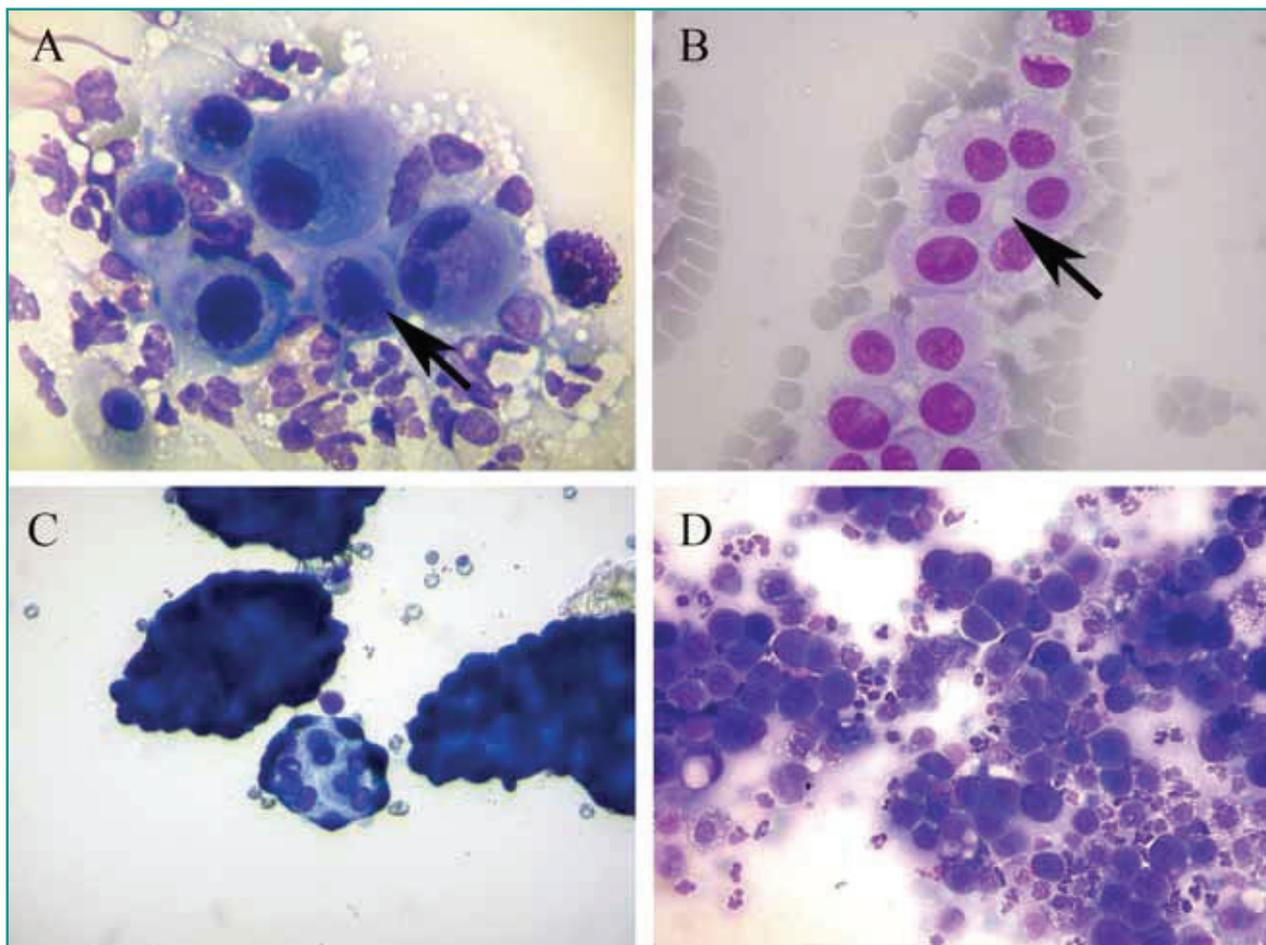


Figura 14 - Diversi aspetti citologici dei carcinomi. **A)** Cellule epiteliali neoplastiche. Gli elementi cellulari di questo carcinoma presentano marcati caratteri di atipia quali variabile dimensione cellulare (anisocitosi) e del nucleo (anisocariosi), variabile rapporto nucleo citoplasma, binucleazioni e molding nucleare (indicato con la freccia) (colorazione di Romanowsky modificata, obiettivo 40x). **B)** Struttura acinare. Gli elementi cellulari si dispongono a formare un cerchio intorno ad un lume (indicato con la freccia) spesso virtuale. La presenza di acini suggerisce la natura ghiandolare della neoplasia (colorazione di Romanowsky modificata, obiettivo 40x). **C)** Le strutture denominate "cell-ball" sono aggregati tridimensionali di forma sferica i cui elementi epiteliali sono molto coesi e presentano nucleo dislocato alla periferia delle cellule. Suggestiscono la probabile origine ovarica del tumore, in particolare l'adenocarcinoma papillare (colorazione di Romanowsky modificata, obiettivo 10x). **D)** Il mesotelioma presenta aspetti citologici spesso indistinguibili dai carcinomi e talvolta anche dalle neoplasie indifferenziate a cellule rotonde. In questo versamento secondario a mesotelioma, sono presenti cellule che esfoliano singole e in piccoli aggregati e presentano forma tendenzialmente rotonda e marcati caratteri di malignità citologica (colorazione di Romanowsky modificata, obiettivo 10x).

la neoplasia risulta spesso impossibile con il solo esame citologico ed è fondamentale procedere con la diagnostica per immagini, se non già eseguita al momento dell'esame citologico. In alcuni casi, gli elementi neoplastici del versamento presentano caratteristiche citologiche peculiari che suggeriscono il tessuto di origine e il tipo specifico di carcinoma (Tabella 5).^{17,65-77} Una particolare e rara forma di versamento associato a neoplasia epiteliale è il versamento mucinoso o pseudomixomatoso, secondario a neoplasie epiteliali in grado di secernere mucina. La sua caratteristica peculiare è l'aspetto macroscopico gelatinoso / viscoso, dovuto alla presenza di mucina nel versamento. In letteratura veterinaria sono descritti casi in cani con adenocarcinoma mucinoso polmonare⁷⁸ e adenocarcinoma mucinoso intestinale.⁷⁹

Dal punto di vista citologico, questo versamento è caratterizzato dalla presenza di materiale amorfo basofilo (bluastro) di fondo e talvolta da strutture proteinaece spiraliformi, simili alle spirali di Curschmann descritte nel lavaggio bronco-alveolare;⁷⁹ la componente cellulare è rappresentata da una popolazione di elementi infiammatori che, da caso a caso, può andare da prevalentemente neutrofila⁷⁸ a macrofagica⁷⁹, e da cellule mesoteliali reattive, oltre da una quantità variabile di cellule epiteliali neoplastiche.^{78,79}

Una delle principali difficoltà del citologo è differenziare tra carcinoma, mesotelioma (Figura 14D) e reattività mesoteliale: queste ultime si attivano facilmente in caso di emorragia e flogosi e manifestano gli stessi caratteri di atipia delle cellule carcinomatose (Figura 4). In questo

Tabella 4 - Caratteristiche citologiche utilizzate per identificare le neoplasie maligne

	Atipia	Descrizione
Cellulari	Anisocitosi, macrocitosi	Dimensione variabile delle cellule, cellule di grandi dimensioni
	Pleomorfismo cellulare	Forma variabile delle cellule
Nucleari	Rapporto nucleo:citoplasma variabile o alto	Il nucleo occupa una superficie variabile o elevata della cellula
	Anisocariosi, macronuclei	Dimensione variabile dei nuclei, nuclei di grandi dimensioni
	Pleomorfismo nucleare	Forma variabile dei nuclei
	Stampi nucleari ("nuclear molding")	Nucleo che si deforma per la pressione di un altro nucleo limitrofo
	Binucleazioni, multinucleazioni	Presenza di più di un nucleo all'interno di una cellula
	Nucleoli multipli, prominenti, di forma variabile	Nucleoli numerosi, ben visibili, che perdono la norma forma rotonda
Generali	Anisonucleolosi, macronucleoli	Nucleoli di forma variabile, nucleoli di diametro > 1 globulo rosso
	Figure mitotiche, figure mitotiche atipiche	Presenza di replicazione cellulare elevata ed incontrollata
	Ridotta coesività ^a	Presenza di elementi isolati per la perdita di adesione tra cellule

^a Riferito alle neoplasie epiteliali

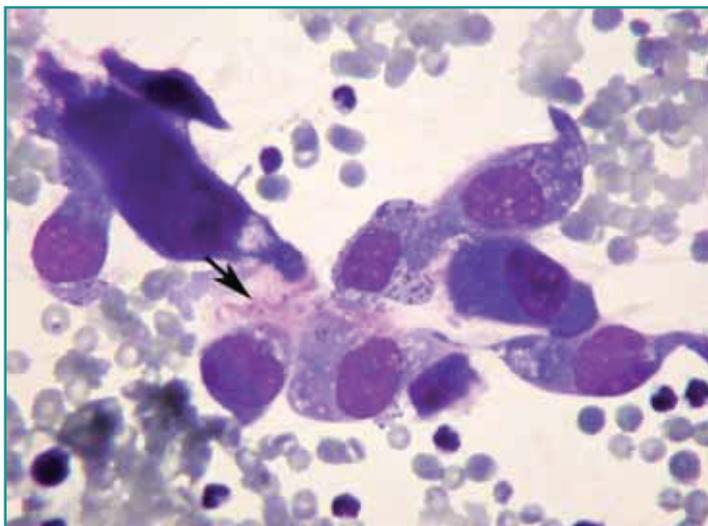


Figura 15 - Cellule mesenchimali neoplastiche. Gli elementi si presentano di grandi dimensioni, di forma da approssimativamente rotonda a fusata e citoplasma bluastrastro. Da notare la presenza di scarso materiale proteinaceo rosato fibroso in prossimità delle cellule (indicato con la freccia) (colorazione di Romanowsky modificata, obiettivo 100x).

Sarcomi

I versamenti associati ai sarcomi solo raramente contengono cellule neoplastiche, per la loro scarsa propensione a cedere elementi nel versamento.²⁰ Quando presenti, le cellule mesenchimali neoplastiche si presentano da ovalari ad allungate - fusiformi o stellate, con margini citoplasmatici poco distinti e nuclei da rotondi a ovali (Figura 15). Tra le neoplasie mesenchimali, l'angiosarcoma è quello più comunemente associato a versamento (pericardico per le localizzazioni cardiache e addominale per localizzazione splenica) che si presenta emorragico per la rottura della neoplasia. Degno di nota è il versamento associato ai mixosarcomi, neoplasie mesenchimali in grado di produrre sostanza mucoide: come segnalato in un *case report*,⁸³ macroscopicamente il versamento si presenta gelatinoso, simile al versamento mucoso / psuedomixomatoso descritto tra le neoplasie epiteliali, e microscopicamente è caratterizzato da un abbondante fondo proteinaceo viscoso, coerente con la presenza della sostanza mucoide.⁸³

CONCLUSIONE

L'esame citologico è un passo imprescindibile nell'approccio diagnostico ai versamenti cavitari. Con il supporto di ulteriori esami di laboratorio quali la conta delle cellule totali, la misurazione delle proteine totali ed un pannello di parametri biochimici sul surnatante, è possibile emettere un elenco di diagnosi differenziali delle cause del versamento ed indirizzare le ulteriori scelte diagnostiche e terapeutiche del clinico.

caso sono necessari ulteriori approfondimenti diagnostici (come la diagnostica per immagini e l'istopatologia del mesotelio) per una diagnosi definitiva.⁸⁰ Gli aspetti citologici a supporto della diagnosi di carcinoma sono la presenza di: elevati criteri di malignità (almeno 5 criteri di malignità nucleari, Tabella 4),^{17,20} citoarchitetture acinari e tubulari,⁸⁰ aggregati cellulari di grandi dimensioni⁸¹ e la presenza di eosinofili (>10%).⁸²

Tabella 5 - Caratteristiche citologiche delle neoplasie epiteliali maligne, proprie degli organi prossimi alle cavità, che possono evolvere in versamenti cavitari

	Sottotipo	Caratteristiche citologiche	Immunocitochimica
Stomaco, piccolo e grande intestino, pancreas esocrino	Adenocarcinoma	Cellule di forma rotonda, citoplasma blu, talvolta vacuolizzato, nucleo rotondo, alto rapporto nucleo:citoplasma, moderati/gravi criteri di malignità (anisocitosi e anisocariosi moderate/gravi, nucleoli prominenti e atipici); citoarchitetture acinari e papillari ¹⁷ (Figura 14A-B). - Alcuni adenocarcinomi gastrici presentano elementi con aspetto di “anello con castone” ovvero con nucleo eccentrico rotondo/ovale e moderato citoplasma. ⁶⁵ - Il raro adenocarcinoma mucinoso presenta forma di “anello con castone”, citoplasma schiumoso con materiale eosinofilo sia nel citoplasma che in ambiente extracellulare che si colora con la colorazione speciale di PAS. ⁶⁶	Citocheratina + Desmina -
	Carcinode (tumore neuroendocrino) ^e	Cellule uniformi per dimensione, aggregati debolmente coesi con numerosi nuclei nudi (privi di margini citoplasmatici evidenti), citoplasma “pallido” (quando visibile) e scarsamente vacuolizzato, nuclei rotondi con cromatina finemente punteggiata, nucleoli indistinti. ⁶⁷	
Ovario	Adenocarcinoma papillare ^a	Cellule di forma rotonda, citoplasma blu chiaro, nucleo ovale tendenzialmente polarizzato, cromatina reticolare, cellule molto coesive in papille tridimensionali sferiche denominate “cell balls” (Figura 14C), strutture acinari/tubulari; caratteri di atipia quali molding nucleare; variabile anisocitosi e anisocariosi. ^{68,69}	Citocheratina + INH-alpha ⁷⁰ - HBME-1 ⁷¹ +
	Neoplasia della granulosa ^b	Cellule meno coesive, in aggregati di tipo prevalentemente monostrato, acinari, tubulari, meno frequenti papille e strutture acinari che circondano del materiale eosinofilo extracellulare (“Call-Exner-like bodies”), capillari talvolta evidenti. ⁶⁸	Citocheratina - INH-alpha ⁷⁰ +/- Vimentina + S100 +; HBME-1 ⁷¹ -
	Disgerminoma	Cellule grandi da rotonde a poligonali, di aspetto pleomorfo, isolate o in aggregati debolmente coesi, scarso citoplasma da blu chiaro a bluastrò-grigiastro, occasionale materiale granuloso eosinofilo intracitoplasmatico, nuclei grandi da rotondi a ovali; caratteri di atipia quali nucleoli spesso multipli e prominenti, bi- multi-nucleazioni, figure mitotiche aberranti, marcate anisocariosi e anisocitosi; possibili piccoli linfociti e plasmacellule. ⁶⁸	Vimentin + Citocheratina - Desmin - S100 - INH-alpha -
	Teratoma ovarico	Fondo necrotico, popolazione infiammatoria neutrofilica – macrofagica, aggregati di sebociti o altre cellule epiteliali mature, cheratociti maturi e detriti cheratinici. ⁶⁸	
Polmone	Carcinomi primari e metastatici ^c	Cellule di forma da rotonda a pleomorfa, da singole a più frequentemente disposte in aggregati, di grandi dimensioni, citoplasma blu, possibili vacuoli citoplasmatici perinucleari; caratteri di atipia quali alto rapporto nucleo:citoplasma, anisocitosi e anisocariosi moderate/gravi, nucleoli prominenti e atipici, sebbene alcuni carcinomi si possano presentare con caratteri di atipia minimi. ⁶⁷ - Le citoarchitetture acinari sono tipiche degli adenocarcinomi ¹⁷ (Figura 14B). - Il carcinoma squamoso presenta elementi cellulari con citoplasma cheratinizzato, ovvero con margini citoplasmatici angolati, citoplasma da ialino a blu chiaro. ^{17,72} - Il carcinoma broncoalveolare canino può presentare un infiltrato eosinofilo. ¹⁷ - La concomitanza di citoarchitetture acinari e squamose è caratteristica del carcinoma broncogenico ¹⁷ e adenosquamoso. ⁷³⁻⁷⁵	
Mesotelio	Mesotelioma ⁷⁶	Cellule di forma rotonda, di grandi dimensioni, singole e disposte in aggregati; citoplasma blu, possibili vacuoli citoplasmatici, gravi caratteri di atipia (Figura 14D).	Citocheratina + Vimentina + Desmina +

^a Il più comune nel cane. Circa la metà evolve in metastasi⁷⁷; ^b Circa il 50% delle neoplasie ovariche nel cane; Il più comune nel gatto;

^c I più comuni: mammari, vescicali, prostatici, ghiandole endocrine.

PUNTI CHIAVE

- L'esame citologico è un test di fondamentale importanza per l'identificazione dei disturbi infiammatori, neoplastici o pressori che possono essere alla base della patogenesi del versamento.
- Quando combinata con opportuni esami strumentali di laboratorio, la citologia dei versamenti cavitari fornisce informazioni utili a classificare il versamento ed emettere una prima lista di diagnosi differenziali.
- Nella maggior parte dei casi l'esame citologico degli essudati settici permette di escludere o confermare la presenza di agenti patogeni consentendo il rapido intervento terapeutico del clinico.
- Il riconoscimento delle cellule tumorali è il primo necessario passo dell'approccio diagnostico al paziente neoplastico sebbene, in certi casi, le cellule mesoteliali reattive o la presenza di abbondante sangue possano rendere dubbia o difficoltosa la diagnosi citologica.

Cytological diagnosis of cavitory effusions of the dog and cat

Summary

The cytological examination is an essential and useful test in the diagnostic approach to cavitory effusions. The microscopic evaluation of the effusion, together with other laboratory tests such as the total nucleated cell count and the clinical chemistry tests, allows a first classification of the disorder and narrows the etiological differential diagnoses. In many cases, such as in septic or aseptic exudates, cytology has the key role to provide useful information about the underlying causes and to support clinician to define the further diagnostic plan and a prompt therapy. Despite the diagnostic accuracy for the identification of some types of effusions is not high (e.g. neoplastic effusions), the cytological examination is essential in every case since it is a mandatory first step to determine causes and pathogenesis of the disease.

BIBLIOGRAFIA

1. Stockham SL, Scott MA. Cavitory effusion. In: Stockham SL, Scott MA. Fundamentals of veterinary clinical pathology 2nd ed. Ames, IA, USA: Wiley-Blackwell; 2008:831-868.
2. Bohn AA. Analysis of Canine Peritoneal Fluid Analysis. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice 47:123-133, 2017.
3. Giordano A, Stranieri A, Rossi G, Paltrinieri S. High diagnostic accuracy of the Sysmex XT-2000iV delta total nucleated cells on effusions for feline infectious peritonitis. Veterinary Clinical Pathology 44:295-302, 2015.
4. Schmiedt C, Tobias KM, Otto CM. Evaluation of Abdominal Fluid: Peripheral Blood Creatinine and Potassium Ratios for Diagnosis of Uroperitoneum in Dogs. Journal of Veterinary Emergency and Critical Care (San Antonio) 11:275-280, 2001.
5. Chartier MA, Hill SL, Sunico S, et al. Pancreas-specific lipase concentrations and amylase and lipase activities in the peritoneal fluid of dogs with suspected pancreatitis. Veterinary Journal 201:385-389, 2014.
6. Guija de Arespacochaga A, Hittmair KM, Schwendenwein I. Comparison of lipase activity in peritoneal fluid of dogs with different pathologies – a complementary diagnostic tool in acute pancreatitis? Journal of Veterinary Medicine. A, Physiology, Pathology, Clinical Medicine 53:119-22, 2006.
7. Smuts CM, Mills JN, Gaál T. Transudate or exudate: can lactate dehydrogenase activity in canine and feline effusions help to differentiate between the 2? Veterinary Clinical Pathology 45:680-688, 2016.
8. Swann H, Hughes D. Use of abdominal fluid pH, pCO₂, [glucose] and [lactate] to differentiate bacterial peritonitis from non-bacterial causes of abdominal effusion in dogs and cats. In: Proceedings of the international Veterinary Emergency and Critical Care Society Meeting, San Antonio (TX, USA): 884, 1996.
9. Bonczynski JJ, Ludwig LL, Barton LJ, et al. Comparison of peritoneal fluid and peripheral blood pH, bicarbonate, glucose, and lactate concentration as a diagnostic tool for septic peritonitis in dogs and cats. Veterinary Surgery 32:161-166, 2003.
10. Levin GM, Bonczynski JJ, Ludwig LL, et al. Lactate as a diagnostic test for septic peritoneal effusions in dogs and cats. Journal of the American Animal Hospital Association 40:364-371, 2004.
11. Braun JP, Guelfi JF, Pages JP. Comparison of four methods for determination of total protein concentrations in pleural and peritoneal fluid from dogs. American Journal of Veterinary Research 62:294-296, 2001.
12. Rose A, Funk D, Neiger R. Comparison of refractometry and biuret assay for measurement of total protein concentration in canine abdominal and pleural fluid specimens. Journal of American Veterinary Medical Association 248:789-794, 2016.
13. Bauer N, Moritz A. Flow cytometric analysis of effusions in dogs and cats with the automated haematology analyser ADVIA 120. Veterinary Record 156:674-678, 2005.
14. Gorman ME, Villarreal A, Tornquist SJ, et al. Comparison between manual and automated total nucleated cell counts using the ADVIA 120 for pleural and peritoneal fluid samples from dogs, cats, horses, and alpacas. Veterinary Clinical Pathology 38:388-391, 2009.
15. Brudvig JM, Swenson CL. Total nucleated cell and leukocyte differential counts in canine pleural and peritoneal fluid and equine synovial fluid samples: comparison of automated and manual methods. Veterinary Clinical Pathology 44:570-579, 2015.
16. Duncan JR, Prasse KW. Veterinary laboratory medicine 1st ed. Ames: Iowa State university press, 1977.
17. Rebar AH, Thompson CA. Body cavity effusion. In: Raskin RE, Meyer DJ. Canine and feline cytology 2nd ed. St. Louis, MO, USA: Saunders Elsevier, 2010: 171-191.

18. Mellanby RJ, Villiers E, Herrtage ME. Canine pleural and mediastinal effusions: a retrospective study of 81 cases. *Journal of Small Animal Practice* 43:447-451, 2002.
19. Davies C, Forrester SD. Pleural effusion in cats: 82 cases (1987 to 1995). *Journal of Small Animal Practice* 37:217-224, 1996.
20. Alleman AR. Abdominal, thoracic, and pericardial effusions. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 33:89-118, 2003.
21. Porcel JM, Light RW. Diagnostic approach to pleural effusion in adults. *American Family Physician* 73:1211-1220, 2006.
22. Sykes JE. Actinomycosis and nocardiosis. In: Greene CE. *Infectious diseases of the dog and cat* 4th ed. St. Louis, MO, USA: Saunders Elsevier, 2012: 485-494
23. Gimeno, P, Pincowski, M, Perez, et al. Proliferative pleuritis caused by actinomycetes hordeovulneris associated with leukaemia in a dog. *Journal of Comparative Pathology* 148:79, 2013 (Abstract).
24. Davies DR, Lucas J. Actinomyces infection in a dog with pulmonary carcinoma. *Australian Veterinary Journal* 81:132-135, 2003.
25. Toomey JM, Carlisle-Nowak MM, Barr SC, et al. Concurrent toxoplasmosis and feline infectious peritonitis in a cat. *Journal of the American Animal Hospital Association* 31:425-428, 1995.
26. Dell'Orco M, Bertazzolo W, Paccioretti F. What is your diagnosis? Peritoneal effusion from a dog. *Veterinary Clinical Pathology* 38:367-369, 2009.
27. Meadows RL, MacWilliams PS, Dzata G, Meinen J. Chylothorax associated with cryptococcal mediastinal granuloma in a cat. *Veterinary Clinical Pathology* 22:109-116, 1993.
28. Letendre J-A, Boysen S. Cranial vena cava syndrome secondary to cryptococcal mediastinal granuloma in a cat. *Canadian Veterinary Journal* 56:365-369, 2015.
29. Caruso KJ, James MP, Fisher D, Paulson RL, Christopher MM. Cytologic diagnosis of peritoneal cestodiasis in dogs caused by *Mesocestoides* sp. *Veterinary Clinical Pathology* 32:50-60, 2003.
30. Bonfanti U, Bertazzolo W, Pagliaro L, et al. Clinical, cytological and molecular evidence of *Mesocestoides* sp. infection in a dog from Italy. *Journal of Veterinary Medicine. A, Physiology, Pathology, Clinical Medicine* 51:435-438, 2004.
31. Stillion JR, Letendre J-A. A clinical review of the pathophysiology, diagnosis, and treatment of pyothorax in dogs and cats. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 25:113-129, 2015.
32. Bartolini F, Didier M, Iudica B, et al. W. What is your diagnosis? Pleural effusion in a dog with a gunshot wound. *Veterinary Clinical Pathology* 44:333-334, 2015.
33. Stranieri A, Giordano A, Paltrinieri S, et al. Comparison of the performance of laboratory tests in the diagnosis of feline infectious peritonitis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 30:459-463, 2018.
34. Epstein SE. Exudative Pleural Diseases in Small Animals. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 44:161-180, 2014.
35. Brenner K, Pohlman L, Muldowney I, et al. Peritoneal EMH in a dog with immune-mediated hemolytic anemia. *Journal of the American Animal Hospital Association* 49:329-332, 2013.
36. Machida N, Tanaka R, Takemura N, et al. Development of Pericardial Mesothelioma in Golden Retrievers with a Long-term History of Idiopathic Haemorrhagic Pericardial Effusion. *Journal of Comparative Pathology* 131:166-175, 2004.
37. Probo M, Valenti V, Venco L, et al. Pleural lymphocyte-rich transudates in cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 20:767-771, 2017.
38. König A, Hartmann K, Mueller RS, Wess G, Schulz BS. Retrospective analysis of pleural effusion in cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. December 2018.
39. Gores BR1, Berg J, Carpenter JL, Ullman SL. Chylous ascites in cats: nine cases (1978-1993). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 205:1161-4, 1994.
40. Boston SE, Moens NM, Martin DM. Idiopathic primary chylopericardium in a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 229:1930-1933, 2006.
41. Nelson KL. Chyloabdomen in a mature cat. *Canadian Veterinary Journal* 42:381-383, 2001.
42. Hatch A, Jandrey KE, Tenwolde MC, Kent MS. Incidence of chyloabdomen diagnosis in dogs and cats and corresponding clinical signs, clinicopathologic test results, and outcomes: 53 cases (1984-2014). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 253:886-892, 2018.
43. Ruiz MD, Vessières F, Ragety GR, Hernandez JL. Characterization of and factors associated with causes of pleural effusion in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 253:181-187, 2018.
44. Hirschberger J, DeNicola DB, Hermanns W, Kraft W. Sensitivity and specificity of cytologic evaluation in the diagnosis of neoplasia in body fluids from dogs and cats. *Veterinary Clinical Pathology* 28:142-146, 1999.
45. Cagle LA, Epstein SE, Owens SD, et al. Diagnostic yield of cytologic analysis of pericardial effusion in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 28:66-71, 2014.
46. Finotello R, Vasconi ME, Sabattini S, et al. Feline large granular lymphocyte lymphoma: An Italian Society of Veterinary Oncology (SIONCOV) retrospective study. *Veterinary and Comparative Oncology* 34:156-158, 2017.
47. MacGregor JM, Faria MLE, Moore AS, et al. Cardiac lymphoma and pericardial effusion in dogs: 12 cases (1994-2004). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 227:1449-1453, 2005.
48. Amati M, Venco L, Roccabianca P, et al. Pericardial lymphoma in seven cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 16:507-512, 2013.
49. Kimura Y, Harada T, Sasaki T, et al. Primary cardiac lymphoma in a 10-week-old dog. *The Journal of Veterinary Medical Science* 80:1716-1719, 2018.
50. Sapieryński R, Kliczkowska-Klarowicz K, Jankowska U, Jagielski D. Cytodiagnoses of canine lymphomas—possibilities and limitations. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 19:433-439, 2016.
51. Comazzi S, Gelain ME. Use of flow cytometric immunophenotyping to refine the cytological diagnosis of canine lymphoma. *Veterinary Journal* 188:149-155, 2011.
52. Burnett RC, Vernau W, Modiano JF, et al. Diagnosis of Canine Lymphoid Neoplasia Using Clonal Rearrangements of Antigen Receptor Genes. *Veterinary Pathology* 40:32-41, 2003.
53. Ponce F, Marchal T, Magnol JP, et al. 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.
54. Valli VE, Jacobs RM, Norris A, et al. The histologic classification of 602 cases of feline lymphoproliferative disease using the National Cancer Institute working formulation. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 12:295-306, 2000.
55. Schmidt ML, Rutteman GR, van Niel MHF, Wolvekamp PTC. Clinical and radiographic manifestations of canine malignant histiocytosis. *Veterinary Quarterly* 15:117-120, 1993.
56. de Souza ML, Torres LF, Rocha NS, et al. Peritoneal effusion in a dog secondary to visceral mast cell tumor. A case report. *Acta Cytologica* 45:89-92, 2001.
57. Cowgill E, Neel J. Pleural fluid from a dog with marked eosinophilia. *Veterinary Clinical Pathology* 32:147-149, 2003.
58. Webb JL, Robat CS. What is your diagnosis? Peritoneal fluid from a dog with epistaxis. *Veterinary Clinical Pathology* 39:253-254, 2009.
59. Rout ED, Shank AMM, Waite AHK, et al. Progression of cutaneous plasmacytoma to plasma cell leukemia in a dog. *Veterinary Clinical Pathology* 46:77-84, 2017.
60. Moore PF. A Review of Histiocytic Diseases of Dogs and Cats. *Veterinary Pathology*. 51:167-184, 2014.
61. Kato Y, Funato R, Hirata A, et al. Immunocytochemical detection of the class A macrophage scavenger receptor CD204 using air-dried cytologic smears of canine histiocytic sarcoma. *Veterinary Clinical Pathology*. 43:589-593, 2014.
62. Kato Y, Murakami M, Hoshino Y, et al. The class A macrophage scavenger receptor CD204 is a useful immunohistochemical marker of canine histiocytic sarcoma. *Journal of Comparative Pathology* 148:188-196, 2013.
63. Yamazaki H, Takagi S, Oh N, et al. Comparative Analysis of mRNA Expression of Surface Antigens between Histiocytic and Nonhistiocytic Sarcoma in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 28:204-210, 2013.
64. Rebhun RB, Culp WTN. Pulmonary neoplasia. In: Withrow SJ, Vail DM, Page RL. *Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology* 5th ed. St. Louis, MO, USA: 2013, 453-462.
65. Riondato F, Miniscalco B, Berio E, et al. Diagnosis of canine gastric adenocarcinoma using squash preparation cytology. *Veterinary Journal* 201:390-394, 2014.

66. Dell'Orco M, Bertazzolo W, Vergine M, et al. Gastric mucinous adenocarcinoma with cutaneous metastases in a dog: diagnosis by fine-needle aspiration cytology. *Journal of Small Animal Practice* 46:449-453, 2005.
67. Haddad JL, Stowe DAM, Neel JA. The gastrointestinal tract. In: Cowell RL, Valenciano AC. *Cowell and Tyler's Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat* 4th ed. St. Louis, MO, USA Elsevier Mosby: 2014, 312-340.
68. Bertazzolo W, Dell'Orco M, Bonfanti U, et al. Cytological features of canine ovarian tumors: a retrospective study of 19 cases. *Journal of Small Animal Practice* 45:539-545, 2004.
69. Bertazzolo W, Bonfanti U, Mazzotti S, Gelain ME. Cytologic features and diagnostic accuracy of analysis of effusions for detection of ovarian carcinoma in dogs. *Veterinary Clinical Pathology* 41:127-132, 2012.
70. Riccardi E, Grieco V, Verganti S, Finazzi M. Immunohistochemical diagnosis of canine ovarian epithelial and granulosa cell tumors. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 19:431-435, 2007.
71. Banco B, Antuofermo E, Borzacchiello G, et al. Canine ovarian tumors: an immunohistochemical study with HBME-1 antibody. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 23:977-981, 2011.
72. Silva JES, Grano FG, Melo GD, et al. Squamous Cell Lung Carcinoma in a Cat. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology* 5:133-136, 2012.
73. Stewart J, Holloway A, Rasotto R, Bowlk K. Characterization of primary pulmonary adenosquamous carcinoma-associated pleural effusion. *Veterinary Clinical Pathology* 45:179-183, 2016.
74. Sato H, Fujino Y, Chino J, et al. Prognostic Analyses on Anatomical and Morphological Classification of Feline Lymphoma. *The Journal of Veterinary Medical Science* 76:807-811, 2014.
75. Sato T, Ito J, Shibuya H, et al. Pulmonary adenosquamous carcinoma in a dog. *Journal of Veterinary Medicine. A, Physiology, Pathology Clinical Medicine* 52:510-513, 2005.
76. Przeździecki R, Sapieryński R. Using of immunocytochemistry in differential diagnosis of neoplasms of serosal cavities in dogs. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 17:149-159, 2014.
77. Patnaik AK, Greenlee PG. Canine ovarian neoplasms: a clinicopathologic study of 71 cases, including histology of 12 granulosa cell tumors. *Veterinary Pathology* 24:509-514, 1987.
78. Tropsch M, Sellon R, Paulson K, Nelson D. Mucinous pleural effusion in a dog with a pulmonary adenocarcinoma and carcinomatosis. *Journal of the American Animal Hospital Association* 51:311-314, 2015.
79. Bertazzolo W, Roccabianca P, Crippa L, Caniatti M. Clinicopathological evidence of pseudomyxoma peritonei in a dog with intestinal mucinous adenocarcinoma. *Journal of the American Animal Hospital Association* 39:72-75, 2003.
80. Milne E, Martinez Pereira Y, Muir C, et al. Immunohistochemical differentiation of reactive from malignant mesothelium as a diagnostic aid in canine pericardial disease. *Journal of Small Animal Practice* 59:261-271, 2018.
81. Friedrichs KR, Young KM. Diagnostic cytopathology in clinical oncology. In: Withrow SJ, Vail DM, Page RL Withrow & MacEwen's *Small Animal Clinical Oncology* 5th ed. St. Louis, MO, USA: 2013, 111-130.
82. Murphy K, Pappasoulis K. Pleural effusions in dogs and cats 1. Diagnostic investigation. In *Practice* 33:462-469, 2011.
83. Riegel CM, Stockham SL, Patton KM, Thomas CL. What is your diagnosis? Muculent pleural effusion from a dog. *Veterinary Clinical Pathology* 37:353-356, 2008.



CERCHI-OFFRI LAVORO?

Il servizio è telematico, libero e gratuito. **Vet-Job** prevede l'utilizzo di un archivio on-line compilato e aggiornato dagli stessi medici veterinari che cercano oppure offrono proposte di lavoro. Il portale registra più di 50.000 visite mensili, con una media di 300 annunci al mese.

Per inserire la propria offerta o richiesta di lavoro è necessaria la registrazione al servizio. Al termine della registrazione il sistema fornirà all'utente un codice che, insieme alla password, consentirà di accedere all'area riservata per modificare/integrare/rimuovere le proprie inserzioni e la scheda dati personale.

Le inserzioni permangono in rete per 90 giorni; alla scadenza di questo periodo vengono rimosse automaticamente.

Registrazione e condizioni d'uso dettagliate al sito:

<http://www.vetjob.it/>

 **VET-JOB**
IL MERCATO ITALIANO DEL LAVORO VETERINARIO
Servizio on-line dell'A.N.M.V.I.