

# Diagnosi di leucemia eritroide acuta (AML-M6) in un cane



Gli autori presentano un caso di leucemia eritroide acuta con componente mieloblastica (AML-M6) in un cane. Questo è il primo caso riportato da quando è stata introdotta la classificazione FAB (French-American-British). La diagnosi è stata formulata tramite esame citologico e ultrastrutturale con microscopia elettronica del midollo osseo. La citofluorimetria, normalmente usata per l'immunofenotipizzazione delle leucemie acute di cane, è risultata inadatta per la valutazione di questo campione, perché i precursori eritroidi venivano lisati insieme agli eritrociti maturi, durante la preparazione del campione stesso.

Valeria Martini, Med Vet, PhD<sup>1\*</sup>,  
 Damiano Stefanello, Med Vet, PhD<sup>1</sup>,  
 Luca Aresu, Med Vet, PhD<sup>2</sup>,  
 Gabriele Ghisleni, Med Vet, dipl ECVCP<sup>1</sup>,  
 Daniela Proverbio, Med Vet, PhD<sup>3</sup>,  
 Marilisa Novacco, Med Vet, PhD<sup>1</sup>,  
 Stefano Comazzi, Med Vet, PhD, dipl ECVCP<sup>1</sup>

## INTRODUZIONE

Le leucemie acute mieloidi (AML) sono classificate secondo il sistema FAB e successive revisioni<sup>1,2</sup>. In passato, l'identificazione della linea cellulare d'origine si basava unicamente su esame citologico e citochimico; oggi invece si ricorre alla citofluorimetria<sup>3,4</sup>. Gli unici quattro casi riferibili a leucemia eritroide acuta con componente mieloblastica (AML-M6) nel cane<sup>5,6</sup> sono stati riportati prima dell'impiego routinario della citofluorimetria nella diagnostica di laboratorio veterinaria: pertanto, la sua utilità nella diagnosi di AML-M6 non è ancora stata definita. Si descrive qui un nuovo caso di AML-M6 del cane, in cui la popolazione neoplastica è stata analizzata tramite citofluorimetria.

## CASO CLINICO

Un cane meticcio, di 27 kg di peso corporeo, maschio, di 10 anni veniva riferito alla nostra attenzione dal veterinario curante per grave pancitopenia persistente da oltre un mese, non responsiva a trattamento con prednisone [Deltacortene<sup>®</sup> cpr 25 mg, Bruno-Farmaceutici spa, Roma] 1 mg/kg/sid, amoxicillina con acido clavulanico [Synulox<sup>®</sup> cpr 250 mg, Zoetis, Roma]

20 mg/kg/bid, e doxiciclina [Ronaxan<sup>®</sup> cpr 250 mg, Merial Italia spa, Milano] 5 mg/kg/sid. L'esame ematocimico comprendente glicemia, proteine totali, albumine, parametri di funzionalità renale ed enzimi epatici, l'esame radiografico diretto del torace nelle tre proiezioni e l'esame ecografico dell'addome erano risultati nella norma. La PCR su sangue intero per la ricerca di *Ehrlichia canis* e *Babesia spp* era risultata negativa.

Si sospettava quindi un'insufficienza midollare, dovuta ad aplasia da mielofibrosi/mielonecrosi, leucemia, sindrome mielodisplastica, pancitopenia immunomediata o infezioni sistemiche (batteriche, micotiche).

Alla visita clinica, l'unico segno clinico rilevabile era il pallore delle mucose esplorabili, associato a depressione del sensorio e disoressia. L'esame emocromocitometrico (CBC) confermava la grave pancitopenia con anemia normocitica normocromica non rigenerativa

**Viene analizzato tramite citologia e citofluorimetria un aspirato midollare di un cane con pancitopenia persistente.**

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Veterinarie e Sanità Pubblica, Università di Milano

<sup>2</sup> Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione, Università di Padova

<sup>3</sup> Dipartimento di Scienze Veterinarie per la Salute, Università di Milano

\* Corresponding author (valeria.martini@unimi.it)

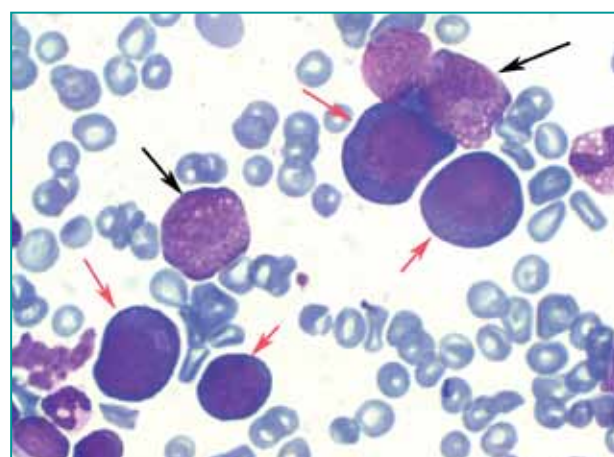
**Tabella 1. Esame emocromocitometrico e formula leucocitaria di un cane con pancitopenia persistente.**

Parametro	Valore	Unità di misura	Intervallo di riferimento
RBC	1.79	$\times 10^6/\mu\text{l}$	(5.7-8.8)
HGB	4.3	g/dl	(12.9-18.4)
HCT	13.6	%	(37.1-57.0)
MCV	76	$\mu\text{m}^3$	(60-77)
MCH	24.0	Pg	(19.5-24.2)
MCHC	31.6	g/dl	(31-36)
RDW	20.2		(11.9-18.5)
Reticolociti (%)	2.7	%	(<1.0)
Reticolociti (Nr)	48.0	$\times 10^3/\mu\text{l}$	(<60.0)
PLT	73	$\times 10^3/\mu\text{l}$	(200-500)
WBC	2.43	$\times 10^3/\mu\text{l}$	(6.0-19.5)
Neutrofili (Nr)	0.70	$\times 10^3/\mu\text{l}$	(3-11.5)
Linfociti (Nr)	1.14	$\times 10^3/\mu\text{l}$	(1-4.8)
Monociti (Nr)	0.10	$\times 10^3/\mu\text{l}$	(0.1-1.5)
Eosinofili (Nr)	0.49	$\times 10^3/\mu\text{l}$	(0.1-1.2)

(Tabella 1). Alla lettura ottica dello striscio ematico non si riscontravano anomalie nella morfologia cellulare. Il cane riceveva una trasfusione di sangue intero fresco (450 ml) come terapia palliativa in attesa di ulteriori esami diagnostici. Dopo cinque giorni, il paziente si presentava più attivo e interessato al cibo; i valori di CBC rimanevano stabili, ma alla lettura dello striscio ematico compariva un ridotto numero di cellule atipiche di medie dimensioni, con elevato rapporto nucleo/citoplasma, citoplasma scarso debolmente basofilo e nucleo paracentrale tondo composto da cromatina dispersa ed occasionali nucleoli. Veniva quindi eseguito un esame citologico dell'aspirato midollare. Il midollo appariva ipercellulare, con rapporto mieloide:eritroide di 0,42; circa il 60% delle cellule nucleate (ANC) era costituito da cellule di grandi dimensioni, con citoplasma blu e alone chiaro perinucleare, nucleo generalmente rotondo con fine cromatina e nucleoli singoli o multipli, riferibili a rubriblasti/prorubriciti (Figura 1). Tra le cellule non eritroidi (NEC), oltre il 40% aveva medie-grandi dimensioni, con citoplasma debolmente basofilo talora contenente granuli azzurofilii, nucleo eccentrico rotondo con cromatina finemente reticolare e nucleoli multipli (mieloblasti).

La popolazione prevalente risultava negativa ai marker testati tramite immunocitochimica (CD45, CD18, CD11b, MPO e fattore VII). Si sospettava quindi una leucemia acuta, probabilmente AML-M6. Al fine di confermare l'origine eritroide della popolazione prevalente escludendo un'origine da altre linee cellulari (linfoidi o mieloidi), veniva eseguita un'analisi citofluorimetrica dell'aspirato midollare. Come descritto in letteratura<sup>7</sup>, si procedeva alla lisi degli eritrociti tramite soluzione di cloruro di ammonio. Il campione risultava composto

da piccoli linfociti e cellule mieloidi, e solo il 23% delle cellule totali aveva fenotipo eritroide (negativo per CD45, marker panleucocitario, e positivo per CD44, espresso da tutte le linee ematopoietiche). Una seconda aliquota dello stesso campione veniva trattata tramite separazione per gradiente di densità (Ficoll-Paque, GE Healthcare, Munich, Germania). Questa tecnica, oltre a separare gli eritrociti dalle cellule nucleate, separa le cellule mononucleate dai polimorfonucleati: solo le prime venivano analizzate in citofluorimetria. Di queste, l'81,6% aveva fenotipo eritroide.

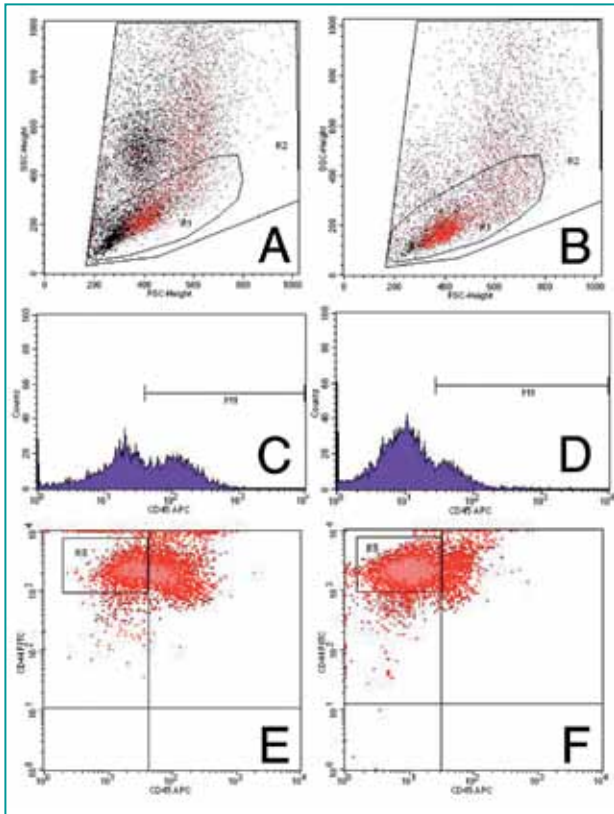


**Figura 1.** Aspirato midollare di un cane con pancitopenia persistente (May-Grunwald Giemsa, 100X). Circa il 60% delle cellule nucleate era costituito da cellule di grandi dimensioni, con citoplasma blu e alone chiaro perinucleare, nucleo generalmente rotondo con fine cromatina e nucleoli singoli o multipli, riferibili a rubriblasti/prorubriciti (freccie rosse). Tra le cellule non eritroidi, oltre il 40% erano mieloblasti (cellule di medie-grandi dimensioni, con citoplasma debolmente basofilo talora contenente granuli azzurofilii, nucleo eccentrico rotondo con cromatina finemente reticolare e nucleoli multipli) (freccie nere).

Per confrontare i risultati, veniva ristretta l'analisi alle sole cellule mononucleate anche nel campione sottoposto a lisi: solo il 54,5% aveva fenotipo eritroide (Figura 2).

Infine, si eseguiva un esame ultrastrutturale al microscopio elettronico dell'aspirato midollare. Venivano analizzate 32 cellule, che avevano forma rotondeggiante.

**La conoscenza di vantaggi e limiti delle singole tecniche diagnostiche è essenziale per scegliere il test diagnostico più utile per ogni singolo caso.**



**Figura 2.** Analisi citofluorimetrica di aspirato midollare di un cane con pancitopenia persistente. Una aliquota del campione era stata sottoposta a lisi degli eritrociti (A, C, E), e una seconda aliquota era stata ottenuta tramite separazione per gradiente (B, D, F). In entrambi i campioni, le analisi sono state effettuate ponendo un gate per escludere il detrito (R2), e un gate per includere solo le cellule mononucleate (R1). Le successive analisi sono state effettuate solo sulla popolazione inclusa in R1. La percentuale di cellule CD45+ sulle cellule mononucleate era di 45,4% per la prima aliquota (C) e di 18,4% nella seconda (D). Le cellule CD44+CD45- sono state poi selezionate tramite *density plot* in entrambe le aliquote (E, F), allo scopo di identificarne la posizione nello *scattergram* morfologico (A, B, punti rossi).

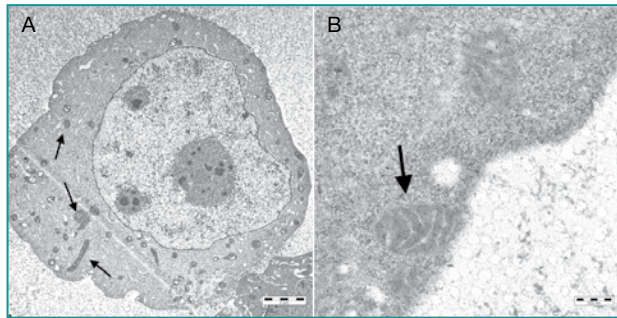
te-ovalare e dimensioni di 12-15  $\mu\text{m}$  di diametro, nuclei con cromatina dispersa e uno o due nucleoli evidenti, e citoplasma contenente un elevato numero di poliribosomi e mitocondri, e un reticolo endoplasmatico con numerose cisterne.

I mitocondri mostravano diffusamente depositi di ferro, confermando l'origine eritroide<sup>8</sup>.

Era quindi confermata la diagnosi di AML-M6 (Figura 3).

Alla luce della prognosi infausta, i proprietari rifiutarono la stadiazione clinica e la chemioterapia e il paziente riceveva come unico trattamento palliativo prednisone [Deltacortene® cpr 25 mg, Bruno-Farmaceutici spa, Roma] a 2 mg/kg/sid.

I proprietari, visto il progressivo peggioramento delle condizioni cliniche, accettavano la scelta eutanasica 10 giorni dopo la diagnosi.



**Figura 3.** Rubriblasti identificati in un aspirato midollare di un cane con pancitopenia persistente. A: le cellule erano tonde-ovalari, con nucleo tondo con cromatina finemente dispersa e nucleolo evidente singolo o multiplo, nel citoplasma era presente materiale elettron-denso e numerosi mitocondri (freccie) (6000X). B: i mitocondri localizzati nel citoplasma contenevano quantità variabili di micelle di ferro tra lamelle e creste (freccia) (8700X).

## DISCUSSIONE

Le AML non sono rare nel cane; tuttavia, da quando è stata introdotta la classificazione ufficiale nel 1991<sup>1</sup>, sono stati segnalati solo due casi di probabile origine eritroide, entrambi riferibili a leucemia eritroide pura (AML-M6Er)<sup>9,10</sup>, mentre i casi di AML-M6 riportati risalgono a prima di tale data e dell'avvento della citofluorimetria<sup>5,6</sup>.

I pazienti umani con AML-M6 generalmente presentano tricitopenia, mentre solo nella metà dei casi si evidenziano cellule neoplastiche circolanti<sup>11,12,13</sup>. Il CBC alla diagnosi rivelava anemia e cellule atipiche circolanti in tutti i cani con AML-M6 riportati in letteratura, associate a leucocitosi in due casi e a trombocitopenia in un caso<sup>5,6</sup>. Nel caso qui riportato, invece, il CBC aveva rivelato da subito tricitopenia, mentre le cellule atipiche sono comparse nello striscio ematico solo dopo alcuni giorni. Pertanto, l'anemia sembra essere l'unico fattore comune ai cani affetti da questa patologia, mentre l'infiltrazione ematica da parte delle cellule neoplastiche è frequente, ma non costante. Sarebbe quindi opportuno valutare il midollo osseo in tutti i cani con citopenie persistenti ad eziologia ignota, in quanto queste potrebbero essere segno di importanti disordini del tessuto ematopoietico come le leucemie acute.

**Il trattamento con soli corticosteroidi non migliora la prognosi per i cani affetti da AML-M6.**

In medicina veterinaria, la diagnosi di leucemia acuta è generalmente formulata in seguito al riscontro di cellule immature in circolo o tramite un esame citologico del midollo osseo. Tuttavia, la sola morfologia non è più considerata sufficiente per identificare la linea cellulare d'origine delle cellule neoplastiche: la citofluorimetria è il test più comunemente utilizzato a questo scopo<sup>3,4</sup>.

Nel presente caso, un sospetto di diagnosi di AML-M6 era emerso in seguito all'esame citologico del midollo osseo, che è stato pertanto analizzato tramite citofluorimetria. Tuttavia, nessuno dei due differenti metodi utilizzati ha dato risultati compatibili con l'aspetto morfologico del campione. Come previsto, nell'aliquota ottenuta per separazione secondo gradiente di densità, non erano presenti cellule polimorfonucleate (granulociti maturi). L'analisi dell'aliquota sottoposta a lisi ha invece rivelato una percentuale di cellule eritroidi nettamente inferiore rispetto a quanto stimato in citologia. Questo fenomeno è probabilmente dovuto alla rottura di parte dei precursori eritroidi insieme agli eritrociti maturi, come dimostrato anche in medicina umana<sup>14</sup>: infatti, restringendo l'analisi alle sole cellule mononucleate, si riscontrava una netta differenza nella percentuale di cellule eritroidi tra le due aliquote. Entrambi questi metodi di processazione del campione si sono quindi rivelati inadatti per la conferma della diagnosi di AML-M6. Per provare definitivamente l'origine eritroide della popolazione cellulare di interesse è quindi stato necessario ricorrere alla microscopia

elettronica. Questa tecnica, ancora poco disponibile in medicina veterinaria a causa soprattutto degli alti costi e della necessità di personale qualificato, può risultare fondamentale per ottenere una diagnosi definitiva in casi selezionati, permettendo l'analisi ultrastrutturale del campione di interesse. Un'attenta valutazione del caso clinico, delle diagnosi differenziali e di vantaggi e limiti delle singole tecniche sono quindi essenziali per scegliere il test diagnostico più utile per ogni caso.

La prognosi per i pazienti umani affetti da AML-M6 è tuttora insoddisfacente, non esistendo terapie specifiche per questo sottotipo di leucemia acuta<sup>15</sup>. In medicina veterinaria, la prognosi per gli animali con leucemia acuta è infausta, indipendentemente dal fenotipo. In particolare, tutti i cani con AML-M6 riportati in letteratura sono deceduti entro pochi giorni, ma nessuno di essi aveva ricevuto trattamenti<sup>5,6</sup>. L'uso di corticosteroidi nel caso qui descritto non ha migliorato la prognosi del paziente. Il protocollo terapeutico più adeguato per il trattamento dei cani con leucemia acuta deve ancora essere identificato.

#### PUNTI CHIAVE

- È opportuno valutare il midollo osseo in tutti i cani con citopenie persistenti ad eziologia ignota.
- La citofluorimetria non sempre è la tecnica più adeguata per definire la linea di origine delle leucemie acute del cane.
- Protocolli terapeutici efficaci per le leucemie acute del cane non sono ancora stati identificati, e la prognosi rimane infausta.

### Acute erythroid leukemia (AML-M6) in a dog

#### Summary

*A case of acute erythroid leukemia (AML-M6) in a dog was reported. This is the first case reported since the FAB classification was adopted. Cytology and electron microscopy of a bone marrow aspirate were used for the diagnosis. Flow cytometry, which is commonly used for the immunophenotyping of canine acute leukemias, was not suitable to analyze this sample, because early erythroid precursors were destroyed by the RBC lysis procedure.*

## BIBLIOGRAFIA

- Jain NC, Blue JT, Grindem CB *et al.* Proposed criteria for classification of acute myeloid leukemia in dogs and cats. *Veterinary Clinical Pathology* 20:63-82, 1991.
- McManus PM. Classification of myeloid neoplasms: a comparative review. *Veterinary Clinical Pathology* 34(3):189-212, 2005.
- Adam F, Villiers E, Watson S, *et al.* Clinical pathological and epidemiological assessment of morphologically and immunologically confirmed canine leukaemia. *Veterinary and Comparative Oncology* 7(3):181-195, 2009.
- Tasca S, Carli E, Caldin M, *et al.* Hematologic abnormalities and flow cytometric immunophenotyping results in dogs with hematopoietic neoplasia: 210 cases (2002-2006). *Veterinary Clinical Pathology* 38(1):2-12, 2009.
- Hejlasz Z. Three cases of erythroleukemia in dogs. *Medycyna Weterynaryjna* 42:346-349, 1986.
- Capelli JL. Erythroleukemia in a dog. *Pratique Medicale and Chirurgicale de l'Animal de Compagnie* 26:337-340, 1990.
- Gelain ME, Mazzilli M, Riondato F *et al.* Aberrant phenotypes and quantitative antigen expression in different subtypes of canine lymphoma by flow cytometry. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 121:179-188, 2008.
- Bessis MC, Breton-Gorius J. Iron metabolism in the bone marrow as seen by electron microscopy: a critical review. *Blood* 19:635-663, 1962.
- Tomiyasu H, Fujino Y, Takahashi M, *et al.* Spontaneous acute erythroblastic leukemia (AML-M6Er) in a dog. *Journal of Small Animal Practice* 52:445-447, 2011.
- Mylonakis ME, Kritsepi-Konstantinou M, Vernau W, *et al.* Presumptive pure erythroid leukemia in a dog. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 24(5):1004-1007, 2012.
- Santos FPS, Faderl S, Garcia-Manero G *et al.* Adult acute erythroleukemia: an analysis of 91 patients treated at a single institution. *Leukemia* 23:2275-2280, 2009.
- Hasserjian RP, Zuo Z, Garcia C *et al.* Acute erythroid leukemia: a reassessment using criteria refined in the 2008 WHO classification. *Blood* 115:1985-1992, 2010.
- Liu CJ, Hong YC, Yang CF *et al.* Clinicopathologic features and outcome of acute erythroid leukemia based on 2008 revised World Health Organization classification. *Leukemia Lymphoma* 53(2):289-294, 2012.
- Allan RW, Ansari-Lari MA, Jordan S. DRAQ5-based, no-lyse, no-wash bone marrow aspirate evaluation by flow cytometry. *American Journal of Clinical Pathology* 129(5):706-713, 2008.
- Park S, Picard F, Azgui Z *et al.* Erythroleukemia: a comparison between the previous FAB approach and the WHO classification. *Leukemia Research* 26:423-429, 2002.

**Tutti i Soci SCIVAC in regola con la quota associativa e i nuovi Soci 2015 riceveranno in omaggio il manuale BSAVA: "Procedure cliniche nel cane e nel gatto" ... un motivo in più per essere Socio SCIVAC!**

NICK BEXFIELD - KARLA LEE  
BSAVA Manuale di procedure cliniche nei piccoli animali  
1° ed. BSAVA giugno 2014  
282 pagg., 200 ill. a colori - formato 17x24 cm  
Edizione italiana a cura di Fabio Viganò  
EV Edizioni Veterinarie



SCIVAC - SOCIETA' CULTURALE ITALIANA VETERINARI PER ANIMALI DA COMPAGNIA - Società Federata ANMVI  
WWW.SCIVAC.IT - INFO@SCIVAC.IT - Tel. +39 0372 460440