

# DISORDINI EMATOPOIETICI NELLA SPECIE FELINA: ASPETTI CLASSIFICATIVI ED ASSOCIAZIONE CON LE PRINCIPALI MALATTIE RETROVIRALI

M.E. GELAIN\*, A. GIORDANO\*, C. MASSERDOTTI\*\*, S. COMAZZI\*

\*Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Sezione di Patologia Generale e Parassitologia  
Università di Milano

\*\*Libero professionista, Clinica S. Antonio, Salò (BS)

## Riassunto

Le neoplasie emopoietiche sono patologie molto frequenti nella specie felina. Si presentano con una grande eterogeneità di forme, con alterazioni che possono colpire sia i tessuti linfoidei che mieloidi. Il loro studio in medicina veterinaria si basa essenzialmente su metodi di classificazione mediati dalla medicina umana, come la French-American-British (FAB) per le leucemie mieloidi e linfoidei o la classificazione World Health Organization (WHO) per i linfomi. Nel gatto è stata inoltre dimostrata l'elevata associazione con infezioni da retrovirus quali il virus della leucemia felina (FeLV) e dell'immunodeficienza felina (FIV).

In questo lavoro sono indagati gli aspetti classificativi di 27 casi di malattie linfo-mieloproliferative attraverso la descrizione morfologica, citochimica ed immunocitochimica. Lo studio è stato inoltre integrato con la ricerca del genoma provirale di FIV e FeLV nei leucociti circolanti mediante Polymerase Chain Reaction (PCR). I risultati hanno evidenziato l'importanza della valutazione citochimica e immunocitochimica per la corretta diagnosi, rispettivamente delle forme mieloidi e linfoidei e hanno confermato il ruolo dei retrovirus nella patogenesi delle leucemie e dei linfomi.

## Summary

*Hematopoietic neoplasms are very frequent in cats. Many different tumors that involve either lymphoid or myeloid tissues. The criteria for the classification of human lymphomyeloproliferative disorders, such as the FAB classification for myeloid and lymphoid leukemias or WHO classification for lymphomas, are applied also in veterinary medicine.*

*In cats, retroviral infections such as FIV and FeLV, are often associated with these disorders.*

*We examined the morphological, cytochemical and immunophenotypic features of 27 cases of lymphomyeloproliferative diseases. We also used PCR techniques to detect the proviral DNA in peripheral blood leukocytes. Our results suggest the importance of cytochemical and immunophenotypic evaluation to make a correct diagnosis of myeloid and lymphoid disorders, respectively. We also confirm the role of FeLV and FIV in the pathogenesis of these tumors.*

## INTRODUZIONE

Le neoplasie emopoietiche del gatto sono caratterizzate da una gamma eterogenea di alterazioni a carico sia dei tessuti linfoidei, che del midollo osseo. Si tratta di patologie frequenti in questa specie in cui le forme linfo-proliferative costituiscono circa un terzo di tutti i tumori<sup>1,2,3</sup>. In medicina veterinaria, lo studio delle leucemie si basa quasi esclusivamente sulla valutazione morfologica,

ed eventualmente citochimica, delle cellule neoplastiche, seguendo le linee guida della classificazione French-American-British (FAB) utilizzata in medicina umana. Anche per quanto riguarda i linfomi vengono utilizzati metodi di classificazione mutuati dalla medicina umana, come la classificazione della World Health Organization (WHO) o la Working Formulation (WF) del National Cancer Institute, basati essenzialmente su aspetti anatomico-patologici e citologici.

Dal punto di vista patogenetico è stata dimostrata l'elevata associazione tra malattie linfo-mieloproliferative e l'infezione da virus della leucemia felina (FeLV) e dell'immunodeficienza felina (FIV)<sup>4</sup>.

“Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione il 10/3/2003 ed accettato per pubblicazione dopo revisione il 15/7/2003”.

Le **leucemie linfoidi acute (ALL)** rappresentano circa il 5-10% delle neoplasie emopoietiche del cane e del gatto<sup>5,6</sup>. Le ALL sono caratterizzate dalla proliferazione clonale nel midollo osseo di progenitori linfoidi maligni scarsamente differenziati<sup>7</sup>, in prevalenza linfoblasti e prolinfociti. Dal punto di vista ematologico, le ALL possono presentare una fase *leucemica*, con leucocitosi ed un elevato numero di blasti in circolo, una fase *subleucemica*, con un numero normale o ridotto di leucociti e pochi blasti circolanti ed una fase *aleucemica*, con leucopenia ed assenza di blasti nel sangue periferico. Le cellule neoplastiche possono infiltrare fegato, milza e linfonodi. Alterazioni secondarie del quadro ematico nei casi più avanzati sono rappresentate da anemia non rigenerativa, neutropenia e trombocitopenia. La classificazione FAB delle ALL nell'uomo identifica la linea cellulare ed il grado di differenziazione (Tab. 1).

**Tabella 1**  
**ALL, classificazione morfologica. Da Fournel-Fleury (1994)<sup>5</sup>**

ALL 1	Piccole cellule, elevato rapporto nucleo-citoplasma. Nucleo regolare, raramente indentato con cromatina omogenea e fine. Nucleoli pressoché invisibili. Citoplasma non molto abbondante, leggermente basofilo.
ALL 2	Quadri eterogenei, cellule di dimensioni variabili, più frequentemente voluminose. Basso rapporto nucleo-citoplasma. Nucleo irregolare con cromatina fine o irregolarmente addensata. Nucleoli voluminosi. Citoplasma abbondante e nettamente basofilo.
ALL 3	Cellule di grandi dimensioni. Nucleo regolare, cromatina con piccoli addensamenti. Uno o più nucleoli voluminosi, citoplasma basofilo (cellule tipo Burkitt).

Le **leucemie linfoidi croniche (CLL)** derivano dalla proliferazione neoplastica di piccoli linfociti con morfologia apparentemente simile a quella delle cellule normali<sup>5</sup>. Caratteristica costante del quadro ematologico è la notevole linfocitosi (da 10.000 a più di 100.000 cellule/ $\mu$ l)<sup>8</sup> con cellule piccole e ben differenziate, nucleo a volte leggermente indentato, cromatina addensata e nucleoli non evidenti. Il medesimo tipo cellulare si ritrova nel midollo osseo, dove la massiva proliferazione porta ad una moderata mielosoppressione delle altre linee cellulari<sup>5</sup>. Le CLL sono neoplasie linfoproliferative meno frequenti rispetto ai linfomi e generalmente con una prognosi migliore<sup>8</sup>. I gatti colpiti da queste forme sono, per la maggior parte, animali anziani FeLV negativi<sup>9</sup>.

Le **leucemie mieloidi acute (AML)** sono disordini mieloproliferativi che originano dalle cellule staminali deputate allo sviluppo della linea granulocitica, monocitica, eritrocitica e megacariocitica. Le AML sono caratterizzate da leucocitosi, presenza di blasti nel sangue periferico, anemia e trombocitopenia. L'esame citologico del midollo osseo è utile per determinare la percentuale di blasti delle varie linee, le caratteristiche di maturazione e il rapporto mieloid:eritroide (M/E). Il sospetto diagnostico di AML viene confermato dalla presenza nel midollo di una percentuale pari ad oltre il 30% di cellule immature, un'anomala maturazione mieloid e un aumento dei precursori eosinofili e basofili. La classificazione FAB di queste forme, adottata dal 1991 anche per gli animali domestici, si basa sull'identificazione della linea cellulare d'origine attraverso l'utilizzo di tecniche citochimiche, immunocitochimiche e citofluorimetriche in supporto alla morfologia, insufficiente in questo caso ad emettere una diagnosi conclusiva. Sono state così distinte 9 differenti forme di AML (Tab. 2)<sup>10</sup>. Tra gli animali domestici sono state osservate con maggior frequenza nel gatto, nel quale prevalgono le forme AML1 e AML2<sup>9</sup>.

Le **leucemie mieloidi croniche (CML)** sono caratterizzate da un graduale aumento delle cellule emopoietiche differenziate, che porta ad un quadro di marcata leucoci-

**Tabella 2**  
**Classificazione leucemie mieloidi**

<i>Leucemie mieloidi acute (AML)*</i>		<i>Leucemie mieloidi croniche (CML)**</i>	
AUL	Leucemia indifferenziata acuta	CGL	Leucemia granulocitica neutrofila cronica
AML 0	Leucemia mieloid e senza maturazione acuta	CBL	Leucemia basofilica cronica
AML 1	Leucemia mieloid e con minima maturazione acuta	CMCL	Leucemia mastocitaria
AML 2	Leucemia mieloid e con maturazione acuta	EL	Leucemia eosinofila cronica
AML 3	Leucemia promielocitica acuta	CMoL	Leucemia monocitica cronica
AML4	Leucemia mielomonocitica acuta	CMMoL	Leucemia mielomonocitica cronica
AML 5	Leucemia monoblastica acuta	MH	Istiocitosi maligna
AML 6	Eritroleucemia acuta	PV	Policitemia vera
AML 7	Leucemia megacariocitica acuta	ET	Trombocitemia essenziale
		MMM	Mielofibrosi con metaplasia mieloid e

\*Da Andrews (2000)<sup>32</sup>.

\*\*Da Messick (2000)<sup>11</sup>.

**Tabella 3**  
**Linfomi, classificazione WF. Da Parodi (2001)<sup>13</sup>**

<i>Linfoma a grado di malignità basso</i>	<i>Linfoma a grado di malignità intermedio</i>	<i>Linfoma a grado di malignità elevato</i>
A piccoli linfociti o plasmocitoide	Follicolare con predominanza di grandi cellule	Immunoblastico a grandi cellule
Follicolare con predominanza di piccole cellule indentate (cleaved)	Diffuso con piccole cellule indentate Diffuso a cellule miste	Linfoblastico a cellule convolute/non convolute A piccole cellule non indentate (linfoma di Burkitt)
Follicolare a cellule miste	Diffuso con grandi cellule indentate/non indentate	

*Stadi clinici\**

- I Un singolo linfonodo colpito
- II Più linfonodi colpiti nella stessa area
- III Linfadenopatia generalizzata
- IV Coinvolgimento di fegato e/o milza (con o senza il passaggio attraverso il III stadio)
- V Interessamento di midollo osseo e sangue periferico, coinvolgimento di altri organi anche non linfoidi (con o senza il passaggio attraverso gli stadi precedenti)

\*Classificazione WHO. Da Vail (2000)<sup>12</sup>.

tosì (100.000/ $\mu$ l), trombocitosi (500.000/ $\mu$ l) e solo modica anemia. Altri reperti rilevabili sono splenomegalia costante, epatomegalia e, occasionalmente, interessamento linfonodale<sup>5</sup>. Caratteristica delle CML è l'evoluzione verso forme acute, le cosiddette crisi blastiche. La morte del paziente è legata ad infiltrazione di vari organi, emorragie e gravi infezioni che si sviluppano sia nelle forme croniche che nelle crisi blastiche. Le leucemie mieloidi croniche possono essere differenziate, in base alla linea cellulare colpita, in diverse forme (Tab. 2), tutte raramente riscontrabili in medicina veterinaria<sup>11</sup>.

I **linfomi** sono le neoplasie linfoproliferative più comuni negli animali domestici. Si tratta della proliferazione di cellule linfoidi maligne, inizialmente a carico di linfonodi o di altri organi parenchimosi come fegato o milza e con eventuale coinvolgimento secondario del midollo osseo e del sangue periferico<sup>12</sup>. Considerate le numerose analogie tra i linfomi animali e i linfomi non-Hodgking umani (NHL), le classificazioni proposte in medicina veterinaria sono basate su criteri utilizzati in medicina umana. Tra queste la "Working Formulation (WF) of the non Hodgkin's lymphomas for clinical usage", proposto dal National Cancer Institute, che ha introdotto una suddivisione in linfomi a basso, intermedio ed alto grado di malignità (Tab. 3)<sup>13</sup>. L'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO) ha poi aggiunto nella classificazione la localizzazione anatomica, individuando 5 stadi clinici (Tab. 3). Nei casi di linfoma al V stadio, con interessamento del midollo e del sangue periferico, risulta impossibile la distinzione da forme di leucemia vera e propria a partenza midollare.

Recenti studi<sup>14</sup> hanno dimostrato come i criteri anatomici e citologici possano essere applicati per la classificazione dei linfomi anche nella specie felina, nella quale Valli e coll. (2000)<sup>14</sup> hanno identificato linfomi sia di grado intermedio (30%) che ad alto grado di malignità (50%). Per

quanto riguarda la sede anatomica, è stato rilevato come i linfomi alimentari siano spesso di tipo linfocitico a piccole cellule, mentre a livello mediastinico i linfomi timici siano caratterizzati da piccole cellule non indentate. Un ulteriore criterio di classificazione è la frequenza delle mitosi, presenti in numero minore nei linfomi a basso o intermedio grado di malignità. Situazione opposta è stata riscontrata nelle forme ad elevato grado di malignità<sup>14</sup> (Tab. 3). I linfomi alimentari colpiscono prevalentemente i gatti FeLV negativi con un'età media di 9-10 anni, mentre le forme mediastiniche e multicentriche sono più frequenti negli animali giovani e FeLV positivi<sup>12</sup>.

Le **sindromi mielodisplasiche (MDS)** sono forme pre-leucemiche, dovute ad alterazioni di una o più linee cellulari del midollo che, al contrario, si presenta normocellulare o ipercellulare. Nelle MDS si ha un moderato aumento dei blasti che, in base alla classificazione FAB, non superano il 30% delle cellule nucleate nel midollo e il 5% nel sangue, limiti che permettono di distinguerle dalle leucemie mieloidi acute<sup>15</sup>.

In medicina veterinaria sono state definite: MDS con predominanza di eritroidi (**MDS-Er**), MDS con citopenia refrattaria (**MDS-RC**), MDS con eccesso di blasti (**MDS-EB**), quest'ultima, la più frequente nel gatto<sup>16</sup>.

Le alterazioni ematologiche più comuni in caso di mielodisplasia sono rappresentate da citopenia di una o più linee cellulari, spesso accompagnata da livelli normali o incrementati delle altre cellule, ed anemia, spesso macrocitica non rigenerativa. Possono inoltre essere presenti eritrociti nucleati, eritroblasti basofili e rubriciti megaloblastici. È frequente la trombocitopenia, con piastrine di dimensioni aumentate e con anomala granulazione. Per quanto riguarda la formula leucocitaria, la percentuale di neutrofili e monociti è normale o inferiore, a volte con un moderato spostamento a sinistra, e con una percentuale di blasti

**Tabella 4**  
**MDS, classificazione in base all'esame del midollo.**  
**Da Blue (2000)<sup>16</sup>**

MDS-Er	Rapporto M:E < 1, blasti (compresi i rubriblasti) < 30% delle cellule nucleate
MDS-RC	Rapporto M:E > 1 blasti < 6% (esclusi i rubriblasti)
MDS-EB	Rapporto M:E > 1 6% < blasti < 29% (esclusi i rubriblasti)

mieloidi circolanti inferiore al 5%. Nella maggior parte dei casi, per la diagnosi definitiva si rende necessario l'esame del midollo osseo (Tab. 4).

Le sindromi mielodisplasiche sono state segnalate con maggior frequenza nel gatto rispetto ad altre specie, con una percentuale di positività al virus FeLV pari all'80%<sup>16</sup>.

## MATERIALI E METODI

Tra tutti i casi pervenuti alla sezione di Patologia Generale Veterinaria negli ultimi tre anni, sono stati analizzati 27 campioni di sangue felino, inviati da veterinari liberi professionisti con sospetto diagnostico di malattia linfomioproliferativa, che è stato confermato da un accurato esame ematologico e/o citologico. Sono stati esclusi i casi nei quali, attraverso la valutazione dei dati clinici, dell'esame emocromocitometrico, della morfologia cellulare e di ulteriori indagini (follow up, esame autoptico), non è stata confermata la diagnosi.

Su tutti i campioni di sangue è stato eseguito l'esame emocromocitometrico completo, mediante analizzatore automatico ad impedenza (SEAC Hemat 8), è stata valutata la formula leucocitaria, la stima piastrinica su vetrino colorato con May Grünwald-Giemsa ed è stata eseguita la conta reticolocitaria su striscio colorato con Blu Brillante di Cresile.

Nei casi in cui è stato possibile, sono stati effettuati prelievi citologici di midollo osseo (14 campioni) e linfonodi (3 campioni) sui quali è stata valutata la morfologia cellulare su striscio colorato con May Grünwald-Giemsa.

In 25 casi su 27, un'aliquota di sangue è stata immediatamente separata e congelata a -30°C per l'estrazione del DNA e per le prove di Polymerase Chain Reaction (PCR). Il DNA è stato estratto mediante un kit commerciale (DNeasy® Tissue Kit, Quiagen) e utilizzato per la ricerca del DNA provirale di FeLV<sup>17</sup> e FIV<sup>18</sup> mediante PCR. I geni amplificati, scelti in base all'elevata conservazione delle sequenze tra i vari ceppi virali, sono stati il gene *gag* per FIV ed il gene *FeLV U3 LTR* (Long Terminal Repeat), per FeLV.

Per le colorazioni citochimiche ed immunocitochimiche sono stati allestiti strisci di sangue, midollo e linfonodi, conservati a -20°C fino all'esecuzione dei test. I vetrini sono stati quindi sottoposti a differenti colorazioni citochimiche: la mieloperossidasi (MPX, prevalentemente presente in cellule mieloidi), la naftil acetato esterasi (NAE, diffusamente evidenziabile nei monociti e in modo focale nei linfociti), la cloracetato esterasi (CAE, tipica dei granulociti), la fosfatasi acida (ACP, presente per lo più nei blasti mieloidi) e la fosfatasi alcalina (ALP, caratteristica dei precursori neutrofilici).

Per la determinazione dell'immunofenotipo delle cellule neoplastiche, sono stati utilizzati i seguenti anticorpi, forniti dal prof. P. Moore (UC Davis, California): CD5 (linfociti T), CD4 (linfociti T helper), CD8 (linfociti T suppressor), CD21 (linfociti B), CD11b (granulociti).

## RISULTATI

### Ematologia

Alla luce dei risultati dell'esame emocromocitometrico e dell'esame morfologico dei 27 campioni (Tab. 5), sono state emesse le diagnosi di:

**Tabella 5**  
**Frequenza delle alterazioni ematologiche e del leucogramma nelle varie classi di patologie**

Alterazioni ematologiche*	ALL/ linfoma V	Linfoma LGL	CLL	AML	CML	Leucemia acuta	MDS	Linfoma aleucemico	Tot.
Anemia	2/7	0/2	2/4	2/5	0/1	1/3	3/4	0/1	10 / 25 (40%)
Macroцитosi	2/7	0/2	0/4	2/5	0/1	1/3	0/4	0/1	5 / 25 (20%)
Trombocitopenia	2/7	0/2	1/4	2/5	1/1	1/3	1/4	0/1	8 / 25 (32%)
Leucocitosi	2/7	2/2	4/4	2/5	1/1	0/3	0/4	0/1	11 / 25 (44%)
Neutrofilia	1/7	2/2	2/4	3/5	1/1	0/3	0/4	0/1	9 / 25 (36%)
Linfocitosi	0/7	1/2	4/4	0/5	1/1	0/3	1/4	0/1	7 / 25 (28%)
Leucopenia	2/7	0/2	0/4	1/5	0/1	2/3	2/4	0/1	7 / 25 (28%)
Presenza di cellule non classificate	7/7	1/2	1/4	5/5	1/1	3/3	3/4	0/1	21 / 27 (78%)

\* Le alterazioni ematologiche fanno riferimento ai seguenti valori: anemia= emoglobina < 8 g/dl; macroцитosi= MCV > 55 fl; leucocitosi= leucociti > 17x10<sup>3</sup>/µl; leucopenia= leucociti < 6x10<sup>3</sup>/µl; neutrofilia=neutrofilii > 12.5x10<sup>3</sup>/µl; linfocitosi= linfociti > 7x10<sup>3</sup>/µl; trombocitopenia= piastrine < 200x10<sup>3</sup>/µl. Da Jain (1986)<sup>33</sup>.

- 7 casi di leucemia linfoide acuta/linfoma leucemico
- 2 casi di linfoma LGL leucemico
- 4 casi di leucemia linfoide cronica
- 5 casi di leucemia mieloide acuta
- 1 caso di leucemia mieloide cronica
- 4 casi di mielodisplasia di cui 2 caratterizzati dalla contemporanea presenza di linfoma
- 3 casi di leucemia acuta non ulteriormente differenziata
- 1 caso di linfoma toracico aleucemico.

L'emogramma ha evidenziato anemia da moderata a molto grave nel 40% (10 su 25) degli esami effettuati. Il basso numero di reticolociti ha permesso di classificare queste forme come non rigenerative, talvolta accompagnate da blanda eritroblastosi, peraltro riscontrata anche in soggetti non anemici. In relazione alle diverse classi di patologia, l'anemia era presente in 5 su 17 casi di leucemia acuta o linfoma leucemico, in 2 su 4 casi di leucemia linfocitica cronica e in 3 mielodisplasie. Non è stata riscontrata invece nell'unico caso di leucemia mieloide cronica e nel caso di linfoma toracico aleucemico, in quest'ultimo caso a conferma della mancata invasione midollare da parte degli elementi neoplastici.

Osservando le costanti eritrocitarie, il volume corpuscolare medio è risultato al di sopra dei valori di riferimento in soli 5 casi su 25 (20%), tutti associati a leucemie acute o linfomi leucemici.

In 18 dei 25 campioni (72%) è stato riscontrato un numero di piastrine inferiore alla norma<sup>19</sup>. Bisogna tuttavia sottolineare come la conta piastrinica automatizzata nel gatto sia spesso sottostimata a causa, sia delle dimensioni elevate delle piastrine, che tendono talvolta ad essere confuse dagli apparecchi con eritrociti microcitici, sia per la frequente presenza di aggregati<sup>20</sup>. Per questo motivo la valutazione della trombocitopenia dovrebbe essere ristretta ai campioni con valori di piastrine inferiori a 100.000/ $\mu$ l, in cui non siano evidenziati aggregati e per i quali la stima piastrinica su vetrino non risulti adeguata. Riferendoci a questi parametri, il numero dei soggetti trombocitopenici scende a 8, rappresentati da 5 casi di leucemia acuta su 17, 1 mielodisplasia su 4, 1 leucemia linfocitica cronica su 4 e l'unica leucemia mieloide cronica osservata.

Analizzando il leucogramma, 11 campioni su 25 (44%) presentavano leucocitosi e in tre di essi i globuli bianchi superavano le 50.000 cellule/ $\mu$ l, alterazione definita "extreme leukocytosis". Nell'unico caso di leucemia mieloide cronica, il numero di leucociti è risultato superiore a 100.000 cell/ $\mu$ l, a conferma di quanto riportato in letteratura<sup>11</sup>. Tutte le forme di leucemia linfocitica cronica sono risultate caratterizzate da leucocitosi superiore a 20.000 cellule/ $\mu$ l, come atteso.

Sette casi (5 leucemie acute e 2 mielodisplasie) hanno invece evidenziato leucopenia.

Il numero dei neutrofili è risultato superiore alla norma in 9 casi (6 leucemie acute, 1 leucemia mieloide cronica, 2 leucemie linfoidi croniche), mentre 7 soggetti presentavano linfocitosi (4 leucemie linfoidi croniche, 1 leucemia mieloide cronica, 1 linfoma LGL e 1 mielodisplasia associata a linfoma). Infine, in 21 su 27 campioni erano evidenziabili, nello striscio ematico, cellule atipiche o non classificabili, mentre in 6 casi (3 leucemie linfoidi croniche, due linfomi leucemici e l'unico linfoma aleucemico) tali elementi cellulari non sono stati riscontrati.

## Citochimica ed immunocitochimica

L'utilizzo delle colorazioni citochimiche e immunocitochimiche ha permesso di ampliare notevolmente le informazioni fornite dalla sola morfologia, di chiarire le forme dubbie e di eseguire una corretta identificazione delle forme mieloidi, secondo la classificazione FAB applicata alla medicina veterinaria come indicato da Jain e coll. (1991)<sup>21</sup> (Tab. 6). Nei casi in cui tali prove non sono state eseguite a causa dell'insufficiente quantità o della cattiva qualità del campione, la diagnosi definitiva si è limitata al sospetto morfologico.

La citochimica si è dimostrata particolarmente efficace per l'identificazione delle forme mieloidi, che hanno costantemente rivelato una positività alla mieloperossidasi, mentre sono risultati negativi i due casi di leucemia linfoide. Nel caso 13 la positività alla MPX, quella diffusa alla NAE, nonché la contemporanea negatività alla CAE e alla ALP, hanno permesso di supporre l'origine mieloblastica degli elementi neoplastici e di effettuare la diagnosi di leucemia monoblastica acuta (M5). In questo soggetto gli elementi blastici sono risultati intensamente positivi alla fosfatasi acida. Nel caso 12 la contemporanea positività a MPX, NAE e CAE ha permesso di emettere la diagnosi di leucemia mielomonocitica (M4), mentre nel caso 15 la contemporanea positività a MPX, CAE, ACP e ALP, insieme alla presenza di un elevato numero di granulociti neutrofili, ha indirizzato verso la diagnosi di leucemia mieloblastica acuta con maturazione (M2)<sup>21,22</sup>. Nell'unico caso di mielodisplasia sul quale sono state effettuate le prove di citochimica (caso n° 20), la positività a tutte le colorazioni ha evidenziato una contemporanea presenza di elementi sia di derivazione granulocitaria che monocitica, ma la presenza di un discreto numero di cellule ad intensa positività focale per la NAE ha suggerito un'infiltrazione midollare da parte di elementi di origine linfoide. Non si esclude pertanto che, anche alla base di questa forma mielodisplastica, così come nei casi 22 e 23, vi potesse essere una neoplasia linfoide extramidollare. Tuttavia la mancanza di ulteriori dati clinico-anamnestici e/o della conferma bioptica non ha permesso di confermare tale sospetto. Infine, nel caso 27, la contemporanea presenza di elementi positivi alla NAE e alla CAE ha confermato il sospetto diagnostico morfologico di leucemia mielomonocitica cronica.

Per quanto riguarda l'analisi immunocitochimica, il pannello di anticorpi utilizzati è stato scelto sulla base della capacità di distinguere tra forme mieloidi (CD11b positive) e linfoidi, per discriminare l'origine da linfociti T (CD5 positivi) e B (CD21 positivi), nonché per determinare l'immunofenotipo dei linfociti T in helper (CD4+/CD8-) e citotossici/suppressori (CD4-/CD8+). Dall'esame dei risultati, le leucemie linfoidi acute/linfomi leucemici hanno rivelato un'origine T in 4 su 7 casi, con una prevalenza di T CD8+ (3 su 7) e un solo caso di sospetta origine B, mentre negli altri casi non è stata evidenziata una positività tale da permettere una diagnosi definitiva. Tutti e quattro i casi di leucemia linfocitica cronica hanno evidenziato un'origine T con due forme di origine T CD8+ e una forma di sospetta origine T CD4+. Infine nel caso 16 di sospetta origine linfoide all'esame morfologico, l'esecuzione delle prove immunocitochimiche ha evidenziato un'intensa positività agli anticorpi verso l'antigene CD11b indirizzando verso la diagnosi di leucemia mieloide acuta.

## Ricerca del DNA provirale

La ricerca del DNA provirale di FIV e FeLV nei leucociti ha evidenziato analogia con i dati ottenuti dalla sierologia, quando disponibili, tranne in un caso (Tab. 6). Su 26 test disponibili, sono state riportate 10 positività al virus della leucemia felina (41%) e 4 positività al virus dell'immunodeficienza felina (15%). Solo il caso n° 18 è risultato sierologicamente positivo ad entrambe le forme virali, ma non sono disponibili i suoi dati riguardanti la ricerca del DNA provirale. In uno solo dei soggetti esaminati (n° 21) si è evidenziata una discrepanza tra esame sierologico e PCR.

Considerando le diverse classi di patologia, 5 su 12 casi di leucemia linfoide acuta o linfoma linfoblastico hanno evidenziato una positività a FeLV mentre uno solo è risultato positivo a FIV.

Le forme mieloidi acute hanno evidenziato una positività per FeLV pari a 3 casi su 5 e una positività su 5 per FIV, mentre l'unico caso di leucemia mielomonocitica è risultato negativo ad entrambi i virus. Le tre forme di leucemia acuta non ulteriormente classificate hanno evidenziato una positività per FeLV e due positività per FIV. Un solo caso di mielodisplasia su 4 è risultato positivo a FIV. Una sola positività per FeLV è stata riscontrata nei 4 casi di leucemia linfoide cronica.

**Tabella 6**  
Risultati delle prove di citochimica e immunocitochimica, degli esami sierologici e della ricerca del DNA provirale e formulazione della diagnosi finale

Caso n°	Sospetto morfologico	CITOCHIMICA					IMMUNOCITOCHIMICA					FeLV		FIV		DIAGNOSI FINALE
		Px	NAE	CAE	ALP	ACP	CD5	CD21	CD4	CD8	CD11	Sierol.	PCR	Sierol.	PCR	
1	ALL/linfoma V						+	-	-	-	-	+	+		-	Leucemia linfoblastica acuta (linfoma V)
2	AML Vs ALL	-	<b>foc.</b>	-	-	+	+	-	-	+	-		-		-	Leucemia linfoblastica acuta (linfoma V)
3	ALL/linfoma V						+		-	+	-		-		-	Leucemia linfoblastica acuta (linfoma V)
4	ALL / linfoma V											+				Leucemia acuta di sospetta origine linfoide (linfoma V)
5	ALL	-	-	-	-	+/-	-		-	-	-		+		-	Leucemia linfocitica cronica
6	Linfoma aleucemico						+	-	-	+	-		+		-	Linfoma aleucemico
7	Linfoma											-	-	-	-	Linfoma LGL leucemico
8	Linfoma LGL leucemico						-	-					-		-	Linfoma LGL leucemico (sospetto null cell)
9	Linfoma						-	+/-	-	-	-	+	+		-	Linfoma
10	Linfoma V												+		-	Linfoma V toracico
11	Linfoma V						-	-	-	-	-		-		-	Linfoma stadio V
12	AML Vs ALL	+	+	+	<b>Occ.</b>	-							-	+	+	Leucemia mielomonocitica acuta (M4)
13	AML	+	<b>dif</b>	-	-	+						+	+		-	Leucemia monoblastica acuta (M5)
14	AML												+		-	Leucemia acuta di sospetta origine mieloide
15	AML	+	-	+	+	+							-		-	Leucemia mieloblastica acuta con maturazione (M2)
16	AML Vs ALL						-		-	-	+	+	+		-	Leucemia mieloide acuta
17	AML Vs ALL												-		-	Leucemia acuta
18	ALL Vs AML											+		+		Leucemia acuta
19	AML Vs ALL												-	+	+	Leucemia acuta
20	MDS-eb	+	<b>foc.</b>	+	+	+							-		-	Mielodisplasia con eccesso di blasti
21	MDS-eb											+	-		-	Mielodisplasia con eccesso di blasti
22	Linfoma + MDS-er												-		-	Linfoma leucemico + Mielodisplasia eritroide
23	Linfoma + MDS-er												-		+	Linfoma + Mielodisplasia eritroide
24	CLL						+/-	-	+/-	-	-		-		-	Leucemia linfocitica cronica
25	CLL						+		-	+	-		-		-	Leucemia linfocitica cronica
26	CLL						+	-	-	+	-		-		-	Leucemia linfocitica cronica
27	CML Vs CMMoL	+	+	+	-	-							-		-	Leucemia mielomonocitica cronica

Foc.= positività focale; dif= positività diffusa; Occ.=positività occasionale

## DISCUSSIONE

Sono state classificate come leucemie acute le forme caratterizzate dalla presenza, nello striscio ematico, di elementi atipici, di aspetto blastico, con nucleoli evidenti, cromatina dispersa e citoplasma abbondante, spesso vacuolizzato (Fig. 1). Nella maggior parte dei casi è stato possibile identificare, anche dal solo esame morfologico, l'origine linfoide o mieloida della neoplasia. Le cellule linfoidi presentano, infatti, nucleo rotondo o lievemente indentato e citoplasma maggiormente basofilo, mentre le forme mieloidi tendono a presentare più spesso nuclei indentati e granulazioni citoplasmatiche con più voluminose vacuolizzazioni (Fig. 2).

In qualche caso, già dalla morfologia è stato possibile sospettare il tipo di leucemia mieloida, come nel caso n° 27, dove la contemporanea presenza di granulociti neutrofili maturi e di monociti portava al sospetto di leucemia mielomonocitica cronica (Fig. 3). Si sono incontrate maggiori difficoltà con le forme mieloidi, dove i precursori

granulocitici e monocitici erano molto difficili da differenziare su base morfologica.

In alcuni casi è stato possibile riscontrare granulazioni azzurrofile evidenti nel citoplasma degli elementi linfoidi, sia nei linfonodi che nel sangue periferico, che hanno permesso di formulare la diagnosi di leucemia/linfoma LGL (Large Granular Lymphocytes) (Fig. 4). L'aspetto morfologico non ha permesso di distinguere le forme di leucemia linfoblastica acuta, a partenza midollare, dalle forme di linfoma leucemico, nelle quali l'invasione midollare è avvenuta secondariamente. L'indicazione diagnostica in questi casi richiederebbe quindi un'accurata stadiazione clinica ed analisi accessorie, come l'esame citologico di milza, linfonodi, versamento o eventuali masse tumorali. Nelle leucemie croniche si è evidenziato un elevato numero di elementi linfoidi o mieloidi di aspetto morfologicamente ben differenziato, a dimostrazione della conservata capacità di maturazione. Tali forme erano spesso caratterizzate da decorso cronico e talvolta risultavano come reperto occasionale di laboratorio, non supportato da sintomatologia

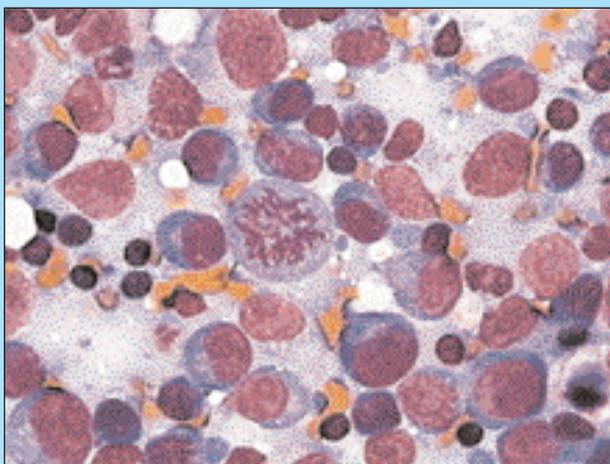


FIGURA 1 - Caso 2, midollo, ALL. Popolazione prevalentemente costituita da cellule linfoidi immature. Presenza di una mitosi atipica (May Grünwald-Giemsa, 1000X).

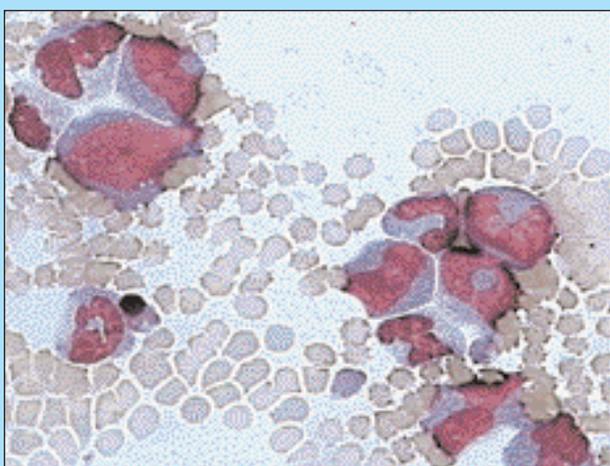


FIGURA 2 - Caso 15, sangue, AML. Si notano voluminose cellule di probabile origine mieloida, caratterizzate da citoplasma granulare e nucleo indentato (May Grünwald-Giemsa, 1000X).

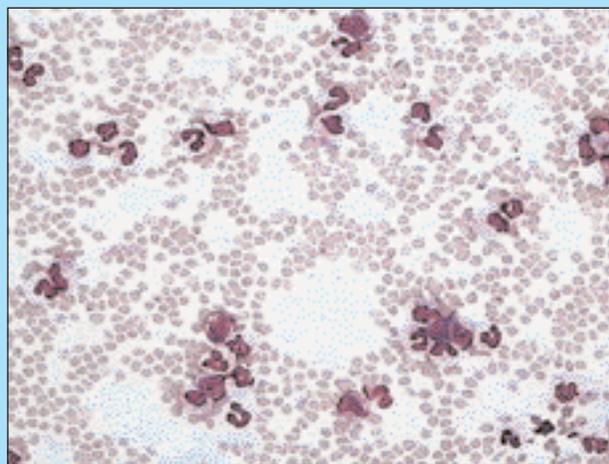


FIGURA 3 - Caso 27, sangue, CMMol. Popolazione mista costituita da numerosi granulociti neutrofili maturi e monociti (May Grünwald-Giemsa, 1000X).

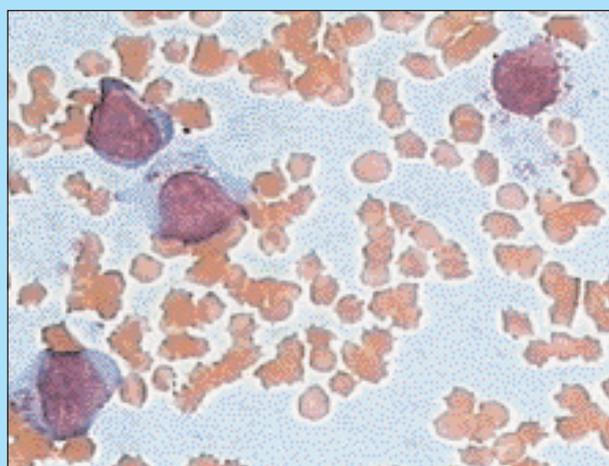


FIGURA 4 - Caso 7, sangue, linfoma LGL leucemico. Si osservano cellule linfoidi caratterizzate da citoplasma abbondante con evidenti granulazioni azzurrofile (May Grünwald-Giemsa, 1000X).

clinica. Alcuni elementi blastici erano tuttavia evidenziabili, seppure in numero limitato.

Col termine "mielodisplasie" sono state classificate le forme caratterizzate morfologicamente da segni di displasia midollare nella linea eritroide (asincronie di maturazione tra nucleo e citoplasma, megaloblasti, granulazioni citoplasmatiche, alterazioni nucleari) o mieloide (granulazioni evidenti, nuclei ad anello, aumentato numero di blasti), spesso accompagnate da citopenia di una o più linee midollari. Tali forme pre-leucemiche nei nostri soggetti sono state riscontrate in due casi che presentavano un linfoma con scarsa o assente invasione midollare. Tra le numerose cause di mielodisplasia nel gatto, l'infezione da virus FeLV risulta sicuramente la più frequente<sup>16</sup>.

Dalla valutazione degli esami emocromocitometrici, si può osservare come l'emogramma, pur essendo un valido ausilio diagnostico, non ha consentito di evidenziare o caratterizzare la patologia in tutti i casi esaminati.

Fra le alterazioni ematologiche riscontrate, l'eritroblastosi, che è stata osservata anche in soggetti non anemici, appare quindi un indice di rigenerazione midollare poco valido, in quanto reperto occasionale in numerose differenti patologie degli animali domestici<sup>9</sup>. La macrocitosi, da noi riscontrata in modo incostante, è stata invece segnalata da numerosi autori come un segno di displasia eritroide spesso presente nelle forme mieloproliferative<sup>23</sup>, così come nelle infezioni da FeLV è stata segnalata anemia macrocitica non rigenerativa, probabilmente imputabile ad un'incompleta divisione cellulare degli eritroblasti<sup>24,25,16</sup>. Per quanto riguarda l'associazione con il virus FeLV, solo in due dei cinque gatti con macrocitosi (casi n° 16 e 10) è stato possibile evidenziare il DNA provirale nei leucociti.

Risulta quindi indispensabile, soprattutto per le leucemie acute, un'accurata valutazione morfologica delle cellule ematiche e midollari, per identificare la presenza degli elementi atipici e suggerire un sospetto diagnostico da confermare successivamente con test più specifici. È da osservare inoltre come, soprattutto nelle forme croniche, siano spesso concomitanti la neutrofilia e la linfocitosi, probabilmente dovute ad una maggior spinta midollare, mediata da fattori di crescita comuni alle due linee cellulari, o ad eventuali complicanze della patologia.

La citochimica si è dimostrata particolarmente utile per la determinazione delle forme mieloidi, le quali hanno costantemente evidenziato una positività degli elementi neoplastici alla mieloperossidasi. Al contrario, i due casi di leucemia linfoide sono risultati negativi alla perossidasi. L'evidenziazione della perossidasi leucocitaria nelle cellule neoplastiche permette di determinare l'origine mieloide, qualora più del 3% degli elementi risulti positivo<sup>21</sup>. Tuttavia, nella specie felina sono segnalate incostanti positività in alcune forme mieloidi quali l'eritroleucemia<sup>22,19</sup>. Per quanto riguarda la fosfatasi acida nella specie felina, non esistono segnalazioni sulla positività a questo enzima negli elementi neoplastici in corso di AML5<sup>22</sup>, nonostante siano segnalate intense positività focali nelle analoghe forme umane<sup>19</sup>.

L'esame immunocitochimico del materiale in nostro possesso non ha fornito in alcuni casi risultati soddisfacenti, a causa probabilmente della scarsa freschezza del campione, dell'inadeguata conservazione e della conseguente scarsa cellularità. In letteratura sono disponibili pochi dati riguardo alla tipizzazione immunofenotipica nei disordini

linfoproliferativi felini. Tuttavia studi recenti hanno evidenziato una prevalenza di forme B nei linfomi<sup>14,26</sup> e di forme T nelle ALL<sup>27</sup>.

Per quanto riguarda l'immunofenotipo delle CLL feline, i dati presenti in letteratura non danno indicazioni, mentre nella specie canina, a differenza dell'uomo, sembra ormai indicata una preponderante frequenza di forme T<sup>28,8,5</sup>. Va tuttavia evidenziato come, sia nelle forme acute che in quelle croniche, non risulta possibile distinguere con sicurezza le vere e proprie forme leucemiche a partenza midollare dalle leucemie secondarie a linfoma (stadio V) rispettivamente di tipo linfoblastico (vs leucemia acuta) e linfocitico (vs leucemia cronica). Dai dati ottenuti si può affermare che l'immunocitochimica appare una valida alternativa alla valutazione dell'immunofenotipo mediante citofluorimetria, da considerarsi tuttavia il metodo elettivo di fenotipizzazione. In particolare l'immunocitochimica, accanto a costi più ridotti, permette di ottenere risultati anche in studi retrospettivi, nonostante alcune difficoltà di conservazione possano talvolta ostacolare l'evidenziazione delle positività.

Per quanto riguarda l'associazione tra l'insorgenza di neoplasie emopoietiche e la presenza di infezioni retrovirali, la positività a FeLV è segnalata prossima al 90% nelle forme mieloidi acute<sup>23</sup> e al 70% nelle forme linfoidi acute rappresentate per la maggior parte da tumori linfoidi T<sup>29</sup>. Il virus FeLV sembra inoltre essere una delle maggiori cause di mielodisplasie nella specie felina, con una positività stimata nell'ordine del 70-80% dei casi<sup>25,16</sup>. Non risultano invece disponibili indicazioni riguardo all'incidenza delle positività a FeLV e FIV nelle forme mieloproliferative croniche.

I dati ottenuti in questo studio confermano quanto presente in letteratura circa la frequente positività al virus FeLV delle forme di leucemia acuta mieloide e linfoide, e nelle mielodisplasie, nonostante la nostra casistica mostri percentuali di positività lievemente inferiori rispetto a quelle descritte. Alla base di questa differenza riteniamo determinante il numero limitato di soggetti da noi esaminati. Va inoltre evidenziata la possibilità di una variazione nell'incidenza delle malattie infettive nella popolazione felina, nonché il fatto che i lavori disponibili si riferiscono per lo più a positività sierologiche.

L'oncogenicità diretta del virus FIV invece non è stata ancora dimostrata, tuttavia secondo alcuni autori l'infezione sembrerebbe associata ad una maggior incidenza di forme tumorali, incluse forme linfoidi<sup>30</sup>. Shelton e coll.<sup>4</sup> hanno calcolato che i gatti sieropositivi a FIV hanno una percentuale di rischio di contrarre leucemie o linfomi 5-6 volte maggiore di quelli sieronegativi, con una prevalenza più alta di forme B o "non-B non-T". La minor incidenza del virus FIV rispetto a FeLV messa in evidenza nel nostro studio, può quindi essere ricondotta al ruolo soltanto indiretto che questo virus svolgerebbe nell'insorgenza di neoplasie emopoietiche.

Per entrambi i virus, si è potuta notare una buona concordanza tra esame sierologico, dove disponibile, e PCR su sangue periferico, così come già segnalato da altri autori<sup>31</sup>. Un solo caso ha presentato discrepanza tra le due metodiche, ma la presenza di animali sieropositivi al test antigenico ELISA e negativi alla PCR su sangue potrebbe essere dovuta ad una antigenemia non correlata a viremia cellulo-associata<sup>31</sup>.

## CONCLUSIONI

Dal nostro lavoro risulta chiaro come la sola analisi morfologica delle neoplasie linfomioproliferative è spesso insufficiente. Questo tipo di patologie necessita di una corretta diagnosi e classificazione per poter valutare correttamente prognosi, risposta alla terapia ed epidemiologia. Il protocollo diagnostico da noi utilizzato ha permesso di classificare buona parte delle patologie, lavorando anche su materiale conservato, in particolare con l'utilizzo delle colorazioni citochimiche, utili nell'identificazione delle forme mieloidi. L'immunocitochimica si è dimostrata d'aiuto per la corretta classificazione delle forme linfoidi soprattutto nei casi con migliori caratteristiche di conservazione. A questo proposito va sottolineata la necessità di disporre di campioni freschi che siano processati e conservati correttamente, in modo da garantire risultati migliori.

Al contrario, si sono potuti effettuare studi anche su sangue congelato grazie all'utilizzo della PCR per la ricerca del DNA provirale di FIV e FeLV, permettendo quindi indagini retrospettive. Nonostante la presenza di un discreto numero di forme linfomioproliferative non associate all'infezione da retrovirus, questi possono comunque essere considerati potenziali agenti correlati alla comparsa di neoplasie emopoietiche, in particolare il virus FeLV.

Conseguentemente si impone la necessità di testare sempre le positività alle principali malattie virali nelle forme linfomioproliferative nel gatto a scopo sia prognostico che epidemiologico.

## Parole chiave

*Gatto, disordini ematopoietici, classificazione.*

## Key words

*Cat, hematopoietic disorders, classification.*

## Bibliografia

- MacVean DW, Monlux AW, Anderson PS Jr, Silberg SL, et al.: frequency of canine and feline tumors in a defined population. *Vet Pathol* 15(6):700-15, 1978.
- Schneider R: Comparison of age- and sex-specific incidence rate patterns of leukemia complex in the cat and the dog. *J Natl Cancer Inst* 70(5):971-7, 1983.
- <http://www.vetmed.lsu.edu/oncology/vmed5272.htm>.
- Shelton GH, Grant CK, Cotter SM, Gardner MB, et al.: Feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus infections and their relationships to lymphoid malignancies in cats: a retrospective study (1968-1988). *J Acquir Immune Defic Syndr* 3(6):623-30, 1990.
- Fournel-Fleury C, Magnol JP, Guelfi JF: Color atlas of cancer cytology of the dog and the cat. Paris, Conference Nationale des vétérinaires spécialisés en petits animaux, 1994.
- McEwen EG, Hess PW: Canine lymphoma-sarcoma and leukemia in current veterinary therapy VI. Ed by R Kirk. Philadelphia, W.B. Saunders, 1977.
- Modiano JF, Helfand SC: Acute lymphocytic leukaemia. In Schalm's veterinary Hematology, Ed by BF Feldman, JG Zinkl, NC Jain. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, 2000, pp 630-637.
- Helfand SC, Modiano JF: Chronic Lymphocytic Leukemia. In Schalm's veterinary Hematology. Ed by BF Feldman, JG Zinkl, NC Jain. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, 2000, pp 637-641.
- Harvey JW: Atlas of veterinary hematology. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 2001.
- Grindem BC: Acute myeloid leukemia. In Schalm's veterinary Hematology. Ed by BF Feldman, JG Zinkl, NC Jain. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, 2000, pp 717-726.
- Messick JB: Chronic myeloid leukaemia. In Schalm's Veterinary Hematology. Ed by BF Feldman, JG Zinkl, NC Jain. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, 2000, pp 733-739.
- Vail DM: Lymphoma. In Schalm's Veterinary Hematology. Ed by BF Feldman, JG Zinkl, NC Jain. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, 2000, pp 620-625.
- Parodi LA: Classification of malignant lymphoma in domestic animals: history and conceptual evolution. *EJVP* 2:43-49, 2001.
- Valli VE, Jacobs RM, Norris A, Couto G, et al.: The histological classification of 602 cases of feline lymphoproliferative disease using the National Cancer Institute Working Formulation. *J Vet Diagn Invest* 12:295-306, 2000.
- Hisasue M, Okayama H, Okayama T, Suzuki T, et al.: Hematologic abnormalities and outcome of 16 cats with myelodysplastic syndromes. *J Vet Inter med*, 471-476, 2001.
- Blue JT: Myelodysplastic syndromes and myelofibrosis. In Schalm's veterinary Hematology. Ed by BF Feldman, JG Zinkl, NC Jain. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, 2000, pp 682-688.
- Jackson ML, Haines DM, Meric SM, Misra V: Feline leukemia virus detection by immunocytochemistry and polymerase chain reaction in formalin-fixed, paraffin-embedded feline lymphosarcoma. *Am J Vet Res* 57:269-276, 1993.
- Goto Y, Nishimura Y, Mizuno T, Endo T, Baba K, Momoi Y, Larari T, Hasegawa A, Tsujimoto H: Quantification of viral ribonucleic acid in plasma of cats naturally infected with Feline Immunodeficiency virus. *Am J Vet Res* 61(12):1690-1614, 2000.
- Jain NC: Schalm's Veterinary Hematology. 4a edizione, Lea & Febiger, Philadelphia, 1986.
- Norman EJ, Barron RCJ, Nash AS, Clappitt RB: Prevalence of low automated platelet counts in cats: comparison with prevalence of thrombocytopenia based on blood smear estimation. *Vet Clin Pathol*, 30:137-140, 2001.
- Jain NC, Blue JT, Grindem CB, Harvey JW, et al.: Proposed Criteria for Classification of Acute Myeloid Leukemia in Dogs and Cats. *Vet Clin Pathol*, 20(3):63-82, 1991.
- Raskin RE, Valenciano A: Cytochemical test for diagnosis of leukemia. In Schalm's Veterinary Hematology. Ed by BF Feldman, JG Zinkl, NC Jain. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, 2000, pp 755-763.
- Blue JT, French TW, Kranz JS: Non lymphoid hematopoietic neoplasia in cats: a retrospective study of 60 cases. *Cornell Vet* 78; 21-42, 1988.
- Shimoda T, Shiranaga N, Mashita T, Hasegawa A: A hematological study on thirteen cats with myelodysplastic syndrome. *J Vet Med Sci*, 62(1):59-64, 2000.
- Willard MD, Tvedten H, Grant TH: Small animal clinical diagnosis by laboratory methods. Philadelphia, WB Saunders Co, 1994.
- Gabor LJ, Canfield PJ, Malik R: Immunophenotypic and histological characterisation of 109 cases of feline lymphosarcoma. *Aust Vet J*, 77(7):436-41, 1999.
- McEwen EG: Feline lymphoma and leukemias. In Small Animal Clinical Oncology. W.B. Saunders, Philadelphia, 1996.
- Vernau W, Moore PF: An immunophenotypic study of canine leukemias and preliminary assessment of clonality by polymerase chain reaction. *Vet Immunol Immunopathol* 69:145-164, 1999.
- Jackson ML, Wood SL, Misra V, Haines DM: Immunohistochemical identification of B and T lymphocytes in formalin-fixed, paraffin-embedded feline lymphosarcomas: relation to feline leukemia virus status, tumor site, and patient age. *Can J Vet Res*, 60(3):199-204, 1996.
- Callanan JJ, Jones BA, Irvine J, Willet BJ, et al.: Histological classification of lymphosarcomas in cats with naturally and experimentally acquired feline immunodeficiency virus infection. *Vet pathol*, 33(3):264-72, 1996.
- Jackson ML, Haines DM, Taylor SM, Misra V: Feline leukemia virus detection by ELISA and PCR in peripheral blood from 68 cats with high, moderate, or low suspicion of having FeLV-related disease. *J Vet Diagn Invest*, 8(1):25-30, 1996.
- Andrews JM: Classification and biology of myeloproliferative disorders. In Schalm's Veterinary Hematology. Ed by BF Feldman, JG Zinkl, NC Jain. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, 2000, pp 673-675.
- Jain NC: Essentials of Veterinary Hematology. Philadelphia, Lea & Febiger, 1993.