

Una possibile ed inusuale causa di eccentrocitosi nel cane?



Un cane Weimaraner maschio intero di otto anni di età è stato sottoposto, a causa di una grave anemia ad eziopatogenesi ignota e prima della visita di referenza presso gli autori, a sei trattamenti (uno a giorni alterni) di autoemoterapia ozonizzante maggiore e successivamente anche ad una trasfusione di sangue intero. Alla visita di referenza è stata accertata una grave anemia normocitica ipocromica non rigenerativa (ematocrito 9%) associata alla presenza di eccentroцитi e segni di emolisi (iperbilirubinemia, emoglobinuria e bilirubinuria). Gli altri accertamenti eseguiti hanno evidenziato uno stato infiammatorio (documentato dall'aumento della proteina C reattiva e del fibrinogeno) e un blocco maturativo della serie eritroide (documentato con l'esame citologico midollare). Gli autori hanno ipotizzato che l'eccentroцитosi possa essere stata indotta dai ripetuti trattamenti di autoemoterapia ozonizzante maggiore (in quanto causa di stress ossidativo cellulare), sebbene possa essere imputabile anche alla trasfusione ematica o allo stato infiammatorio.

Giulia De Feo
Med Vet, Master in Oncologia
Veterinaria, Capannori, Lucca

Ilaria Lensi
Med Vet, Clinica Veterinaria
Colombo, Lido di Camaiore, Lucca

George Lubas*
Med Vet, EBVS® European
Veterinary Specialist in Small Animal
Internal Medicine,
Clinica Veterinaria Colombo,
Lido di Camaiore, Lucca

INTRODUZIONE

L'eccentrocitita è un eritrocita in cui l'emoglobina risulta spostata verso un versante della cellula, con l'opposta porzione cellulare priva di emoglobina e pertanto ipocromatica. Nella letteratura internazionale questo tipo di cellula è anche chiamata "hemi-ghost cell" ("cellula semi fantasma"), "irregularly contracted cell" ("cellula irregolarmente contratta"), "double-colored cell" ("cellula con doppia colorazione") o "cross-banded erythrocyte" ("eritrocita incrociato"). La sua formazione è dovuta ad un danno ossidativo della membrana eritrocitaria, con successiva adesione di aree opposte della faccia citoplasmatica della membrana probabilmente a seguito del restrin-

Gli eccentroцитi sono causati da un'aumentata quantità di ossidanti endogeni presenti nel sangue. Tra le altre cause di eccentroцитosi sono incluse la trasfusione di sangue e l'infiammazione.

gimento osmotico o dello schiacciamento attraverso la microcircolazione^{1,2}. Nel cane, la presenza di eccentroцитi è stata associata ad un'aumentata quantità di ossidanti endogeni causata da diabete chetoacidotico, infiammazione, neoplasia (linfoma) e infezione da *Babesia canis*^{3,4}. Inoltre, è stata documentata in corso di ingestione di cipolle o aglio e di somministrazione di farmaci (probabilmente in sovradosaggio o

*Corresponding author: george.lubas.vet@gmail.com

Ricevuto: 24/09/2023 - Accettato: 16/01/2024

Esistono due tipi di autoemoterapia ozonizzante sul sangue reso incoagulabile: maggiore (M-O₃-AHT) in ragione di circa 1-2 mL/kg del paziente e minore (m-O₃-AHT) con al massimo 5 mL per paziente.

per ipersensibilità del paziente) quali paracetamolo, antiinfiammatori non steroidei, immunosoppressori non steroidei (azatioprina o ciclosporina), propofol, nonché in seguito all'assunzione di rodenticidi antagonisti della vitamina K, della stessa vitamina K o di naftalina^{1,2}. Infine, è segnalata in cani che avevano ricevuto una trasfusione di sangue intero³.

L'ozono è noto per i suoi effetti antisettici e terapeutici determinati dalla teoria dell'ormesi. È dimostrato in

medicina umana che l'efficacia terapeutica dell'ozonoterapia può essere in parte dovuta allo stress ossidativo controllato e moderato prodotto dalla reazione dell'ozono con diversi componenti biologici⁵. L'autoe-moinfusione di ossigeno-ozono consiste in una procedura di trattamento extracorporeo del sangue con gas ozono. Le tipologie di questo trattamento sono due in dipendenza della quantità di sangue trattato. L'autoe-moterapia ozonizzante maggiore (major ozonated autohemotherapy, M-O₃-AHT) consiste nel prelievo di una quantità di sangue variabile, reso incoagulabile, in base al peso del paziente (da 50 mL fino ad un massimo di 225 mL e in ragione di circa 1-2 mL/kg, sia in medicina umana che in medicina veterinaria), nel quale viene instillata una precisa miscela di O₂ e O₃ e successivamente il sangue ossigenato-ozonizzato viene reinfuso nel paziente.

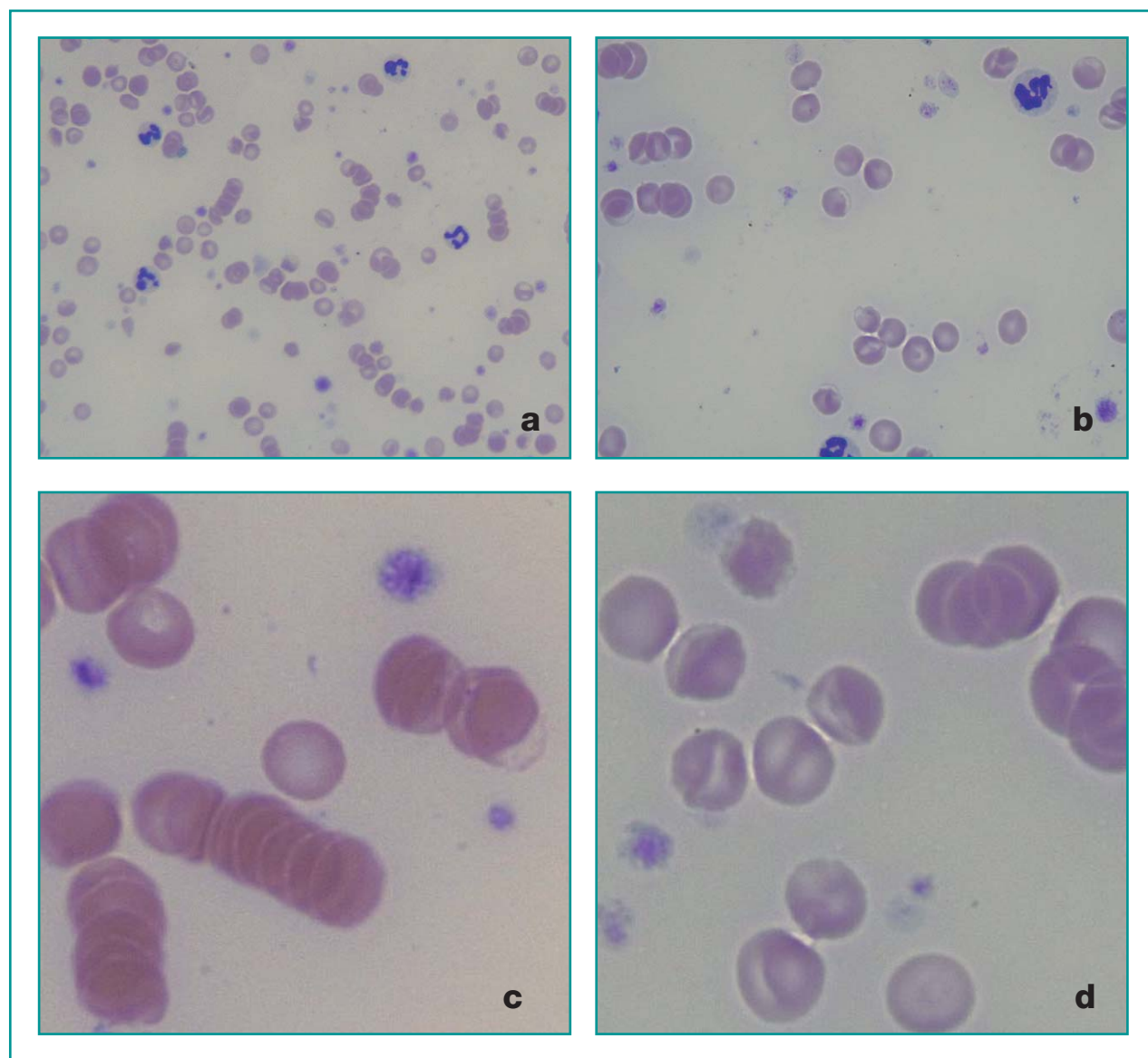


Figura 1 - Strisci ematici colorati con May Grundwald-Giemsa, ingrandimento 200x (a), 400x (b) e 1000x (c,d).

Tabella 1 - Risultati dell'esame emocromocitometrico eseguito presso il veterinario referente (T0) circa 24 ore prima dell'esame emocromocitometrico eseguito dagli autori (T1).

Parametro	Unità	T0 ⁽¹⁾	IR a T0 ⁽¹⁾	T1 ⁽²⁾	IR a T1 ⁽²⁾
RBC	M/ μ L	1,62	5,7-8,0	1,18	5,65-8,87
HGB	g/dL	3,3	12,0-18,0	2,6	13,1-20,5
HCT	%	9,9	36-48	8,4	37,3-61,7
MCV	fL	61,3	59-68	71,2	61,6-73,5
MCH	pg	20,3	26-32	22	21,2-25,9
MCHC	g/dL	33,3	32-36	31	32,0-37,9
RDW	%	13,7	11,5-14,5	ND	13,6-21,7
RETS	K/ μ L	ND	NA	14,8	10,0-110,0
Retic-HGB	pg	ND	NA	22,6	22,3-29,6
WBC	K/ μ L	24,2	5,2-13,9	21,1	5,05-16,76
Neu	K/ μ L	4,4 ⁽¹⁾	4,7-14,0	15,16 ⁽³⁾	2,95-11,64
Lym	K/ μ L	15,1 ⁽¹⁾	1,0-92	2,92	1,05-5,10
Mon	K/ μ L	4,7 ⁽¹⁾	0,1-3,8	2,91	0,16-1,12
Eos	K/ μ L	ND	NA	0,08	0,06-1,23
Bas	K/ μ L	ND	NA	0,03	0,0-0,1
PLT	K/ μ L	422	100-400	445	148-484
MPV	fL	14,3	7,4-10,4	19,0	8,7-13,2
PDW	fL	30	10-14	ND	9,1-19,4
PCT	%	0,6	0,1-0,3	0,85	0,14-0,46
Stima PLT	NA	ND	ND	aumentata	adeguata

Annotazioni:

(1) Eseguito con contaglobuli ad impedenza elettrica con conta leucocitaria automatizzata in tre popolazioni.

(2) Eseguito con contaglobuli combinato laser-impedenza con conta leucocitaria automatizzata in cinque popolazioni; la conta leucocitaria differenziale è stata confermata con l'osservazione di uno striscio ematico.

(3) Rilevati anche rari neutrofili banda all'osservazione dello striscio ematico (0.15 K/ μ L, IR 0.0-0.3).

Legenda: IR, intervallo di riferimento; ND, non determinato; NA, non applicabile; in neretto i parametri alterati

L'autoemoterapia ozonizzante minore (minor ozonated autohemotherapy, m-O₃-AHT) consiste invece nel prelevare e trattare una minore quantità di sangue (circa 5 mL) sempre con una miscela di gas O₂-O₃^{5,6,7}.

In questo caso clinico viene descritta la presenza di ec-centrociti in un cane gravemente anemico che aveva ricevuto varie autoemoinfusioni di ozono (M-O₃-AHT), oltre ad una trasfusione di sangue intero.

DESCRIZIONE DEL CASO CLINICO

Un cane Weimaraner, maschio intero di otto anni di età, viene riferito per grave anemia (Tabella 1, T0, Tabella 2 T0), insorta nelle due settimane precedenti. Le indagini diagnostiche eseguite dal veterinario referente non permettevano di classificare correttamente l'anemia, in quanto non comprendevano una valutazione morfologica dello striscio ematico né la conta reticolocitaria. All'esordio della sintomatologia, il veterinario referente aveva somministrato una dose di vitamina K1 (5 mg/kg, EV) e poi giornalmente desametasone (0,1 mg/kg SID, SC) e amoxicillina-clavulanato (20 mg/kg BID, PO). Inoltre, aveva somministrato endovena una M-O₃-AHT a giorni alterni per un totale di sei somministrazioni. Infine, due giorni prima di rife-

In un cane con grave anemia non rigenerativa è stata impiegata l'autoemoterapia ozonizzante maggiore.

rire il caso, aveva eseguito una trasfusione di sangue intero fresco, senza emotipizzazione e verifica della emocompatibilità crociata tra donatore e ricevente, unitamente alla sesta somministrazione di M-O₃-AHT. Alla visita di referenza presso gli autori, il paziente presentava depressione del sensorio, mucose pallide e subitteriche, tachicardia (143 bpm), tachipnea (52 apm) e temperatura nei limiti della norma (38,5°C). Il microematocrito risultava del 9% ed il plasma appariva lievemente itterico.

È stato quindi impostato un piano diagnostico iniziale comprensivo di esame emocromocitometrico con valutazione morfologica dello striscio ematico, profilo biochimico sierico, sieroelettroforesi, profilo coagulativo, esame delle urine, tipizzazione ematica ed ecografia addominale. L'esame emocromocitometrico rivelava una grave anemia normocitica ipocromica non rigenerativa associata a lieve leucocitosi neutrofila con lieve deviazione a sinistra e monocitosi, conteggio

Tabella 2 - Profilo biochimico sierico.

Parametri	Unità	T1	IR
Aspartato transaminasi	IU/L	108	15-40
Alanina transaminasi	IU/L	595	20-70
Fosfatasi Alcalina	IU/L	719	45-250
Gamma glutamil transferasi	IU/L	2	2-11
Creatin-fosfochinasi	IU/L	492	40-185
Lattato deidrogenasi	IU/L	2256	20-160
Amilasi	IU/L	892	400-1500
Glucosio	mg/dL	99	80-125
Fruttosamina	μmol/L	459	170-430
Urea	mg/dL	54	15-55
Creatinina	mg/dL	1.5	0.6-1.5
Bilirubina totale	mg/dL	0.92	0.07-0.3
Colesterolo	mg/dL	245	120-280
Trigliceridi	mg/dL	51	25-90
Proteine totali	g/dL	7.9	5.8-7.8
Albumina	g/dL	3.2	2.6-4.1
Rapporto A/G	NA	0.82	0.7-1.3
Proteina C-Reattiva	mg/L	0.80	0.0-0.3
Calcio	mg/dL	11.1	8.7-11.9
Fosfati	mg/dL	5.1	2.5-5.0
Sodio	mEq/L	146	146-156
Potassio	mEq/L	5.9	3.9-5.5
Cloro	mEq/L	121	109-122
Bicarbonati	mEq/L	21	21-31
Divario anionico	mEq/L	9.9	12-24
Magnesio	mg/dL	2.3	1.6-2.7
Ferro	μg/dL	385	80-190
Aspetto del siero	NA	itterico	trasparente

NA, non applicabile; in neretto i parametri alterati

Tabella 3 - Esame completo delle urine (prelievo per cistocentesi).

Parametri	Unità	T1	IR
Colore	NA	Giallo carico	Giallo paglierino
Aspetto	NA	Limpido	Limpido
Peso specifico	NA	1023	1010-1060
pH	NA	6,5	5,5-7,5
Glucosio	mg/dL	Neg.	0,0
Bilirubina mg/dL	mg/dL	6	0,0
Chetoni mg/dL	mg/dL	15	0,0
Sangue-RBC	RBC/μL	500	Neg.
Proteine mg/dL	mg/dL	100	0,0-50
Rapporto PU/CU	NA	1,30	0,0-0,5
WBC/HPF	NA	3	0-5
RBC/HPF	NA	Ass.	0-5
Cilindri	NA	Fini granulari +/-	Ass.-rari
Cristalli	NA	Bilirubina ++	Ass.-rari
Batteri	NA	Ass.	Ass.-rari
Cellule epiteliali	NA	rare	Ass.-rare

Neg., negativo; Ass., assente, NA, non applicabile; in neretto i parametri alterati

piastrinico nella norma (Tabella 1, T1). L'esame dello striscio ematico colorato con May-Grundwald-Giemsa (MGG) confermava la stima piastrinica adeguata ed evidenziava alcune importanti anomalie eritrocitarie (Figura 1), tra cui una moderata anisocitosi (++), presenza di rouleaux (++) , lieve ipocromia (+) ed alterazioni morfologiche quali eccentricitosi (++), leptocitosi (++) e cnizocitosi (++) .

Il profilo biochimico sierico evidenziava un moderato aumento di aspartato transaminasi, fosfatasi alcalina e creatinfosfochinasi e un marcato aumento di alanina transaminasi e lattato deidrogenasi. Inoltre, si osservava un moderato aumento della bilirubina totale, proteina C reattiva e ferro (Tabella 2).

La sierolettroforesi su gel di agarosio evidenziava un pattern normale del grafico e valori percentuali delle varie frazioni nella norma.

Il profilo coagulativo segnalava un aumento del fibrinogeno (873 mg/dL, IR 125-335) e valori nella norma per tempo di protrombina e tempo di tromboplastina parziale attivata.

L'esame delle urine mostrava emoglobinuria (++++) e bilirubinuria (++) (vedi Tabella 3).

L'ecografia addominale segnalava lieve epatomegalia, lieve splenomegalia, edema della parete della cistifellea e presenza di lieve versamento peritoneale (Abdominal Fluid Score 2)⁸.

Successivamente, a fronte dello stato di grave anemia non rigenerativa emerso dagli esami diagnostici iniziali, è stato eseguito l'esame citologico del midollo osseo. Questo accertamento evidenziava un rapporto mielo/eritroide aumentato (> 1), con iperplasia mieloidale e megacariocitaria e arresto maturativo della serie eritroide, associati a lieve infiltrazione linfoplasmacellulare.

DISCUSSIONE

Il paziente è stato presentato con una grave anemia normocitica ipocromica non rigenerativa associata a diverse alterazioni morfologiche degli eritrociti (eccentricociti, leptociti e cnizociti), ad un importante stato infiammatorio e ad un lieve aumento della bilirubina, segni potenzialmente compatibili con una emolisi, ma che generalmente si associano ad anemia rigenerativa. Il paziente presentava inoltre una eritropoiesi inefficace, come dimostrato dall'arresto maturativo eritroide evidenziato all'esame citologico midollare. Tra le diagnosi differenziali di eritropoiesi inefficace si annovera in prima istanza una anemia emolitica immunomediata non rigenerativa e, nel caso in oggetto, il danno immunomediato midollare potrebbe essere stato indotto dal grave stato infiammatorio o dai farmaci/trattamenti impiegati; tuttavia, la causa è rimasta purtroppo ignota⁹.

Come possibile causa dell'eccentricitosi è stata ipotizzata l'autoemoterapia ozonizzante maggiore e la trasfusione di sangue senza adeguate prove di compatibilità emogruppale.

In merito all'eccentricitosi, un'attenta e dettagliata anamnesi ha escluso l'assunzione di sostanze ossidanti tra quelle descritte in letteratura come causa di eccentricitosi nel cane, pertanto è stata verosimilmente collegata alle ripetute somministrazioni di M-O₃-AHT. Questo tipo di trattamento promuove l'attivazione del metabolismo eritrocitario con un aumento del 2,3-difosfoglicerato e di adenosina trifosfato, l'aumento del rilascio di ossigeno verso i tessuti e l'attivazione delle cellule immunocompetenti con il rilascio di citochine, come ad esempio interferoni e interleuchine^{5,6,7}. Il dosaggio di ozono e il tipo di trattamento di ozonizzazione del sangue intero anticoagulato possono alterare la struttura dell'emoglobina. Infatti, studi recenti condotti su soggetti umani sani ed affetti da differenti patologie, evidenziano l'importanza dell'uso di dosi appropriate di ozono e di tecniche di ozonizzazione in ragione dei differenti livelli ematici di antiossidanti dei

riceventi la M-O₃-AHT^{10,11}. Nel nostro caso, tuttavia, non è possibile escludere che anche la trasfusione di sangue intero eseguita senza accertamenti del gruppo sanguigno e delle prove di compatibilità abbia potuto indurre l'eccentricitosi³. Difficile risulta avere prove documentali certe circa l'associazione tra eccentricitosi e queste potenziali cause.

riceventi la M-O₃-AHT^{10,11}. Nel nostro caso, tuttavia, non è possibile escludere che anche la trasfusione di sangue intero eseguita senza accertamenti del gruppo sanguigno e delle prove di compatibilità abbia potuto indurre l'eccentricitosi³. Difficile risulta avere prove documentali certe circa l'associazione tra eccentricitosi e queste potenziali cause.

In conclusione, l'eccentricitosi e il conseguente processo emolitico che risulta dalla distruzione accelerata di queste cellule potrebbe in questo caso derivare dalla combinazione della potenziale tossicità del trattamento con M-O₃-AHT, dalla trasfusione di sangue intero non tipizzato e dallo stato infiammatorio. Tenendo conto delle recenti applicazioni della ozonoterapia anche in medicina veterinaria, risulta importante segnalare la possibile comparsa di eccentricitosi nel cane in seguito a questo tipo di trattamento ripetuto nel tempo, come illustrato in questo caso clinico^{6,7}.

Al momento non esiste ancora un protocollo definitivo né un'evidenza scientifica circa l'efficacia dell'autoemoterapia ozonizzante maggiore. Utile sarebbe uno studio prospettico al fine di dimostrare se l'autoemoterapia ozonizzante possa indurre eccentricitosi di qualsiasi entità nel cane, impiegando anche differenti dosaggi di ozono e diversi protocolli di trattamento.

PUNTI CHIAVE

- La comparsa di eccentriciti segnala una elevata presenza di ossidanti endogeni nel sangue
- L'eccentricitosi si può osservare anche nell'infiammazione o nella trasfusione di sangue
- Nel cane è possibile l'autoemoterapia ozonizzante maggiore
- Non esiste ancora un protocollo definitivo né un'evidenza scientifica circa l'efficacia dell'autoemoterapia ozonizzante maggiore
- Occorre tenere in considerazione i possibili effetti secondari dell'autoemoterapia ozonizzante maggiore come la presenza di eccentriciti

A possible and unusual cause of eccentricity in dogs?

Summary

An eight-year-old male entire Weimaraner dog with a diagnosis of severe anemia of unknown etiology, was treated with six treatments of major ozone autobemotherapy (every other day) followed by whole blood transfusion by the referring veterinary surgeons, prior referral to the authors. On referral consultation, a severe normocytic hypochromic non regenerative anemia (hematocrit 9%) was observed, associated with eccentricocytes and hemolysis (hyperbilirubinemia, hemoglobinuria and bilirubinuria). The other diagnostic investigations showed an inflammation (documented by an increase in C reactive protein and fibrinogen) and an arrest in the erythroid lineage maturation (documented with the bone marrow cytology). The authors' hypothesis is that eccentricity has been caused by repeated major ozone autobemotherapy administrations (as it causes oxidative cellular stress), even if blood transfusion or the inflammation as causes of eccentricity cannot be ruled out.

BIBLIOGRAFIA

1. Harvey JW Ch. 4 Evaluation of erythrocytes. In: Harvey J.W. Veterinary Hematology: A diagnostic Guide and Color Atlas, Elsevier Saunders St. Louis, MI, USA, 2012, pp. 49-121.
2. Behling-Kelly E., Newmann A. Ch. 32 – Anemia associated with oxidative injury. In: Schalm's Veterinary Hematology, Brooks M.B., Harr K.E., Seeling D.M., Wardrop K.J., Weiss D.J., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2022, 252-259
3. Caldin M, Carli E, Furlanello T, *et al.* A retrospective study of 60 cases of eccentrocytosis in the dog. *Veterinary Clinical Pathology*, 34:224-231, 2005.
4. Carli E, Tasca S, Trotta M, *et al.* Detection of erythrocyte binding IgM and IgG by flow cytometry in sick dogs with *Babesia canis canis* or *Babesia canis vogeli* infection. *Veterinary Parasitology*, 162:51-57, 2009.
5. Bocci V, Zanardi I, Travagli V. Oxygen/ozone as a medical mixture. A critical evaluation of the various methods clarifies positive and negative aspects. *Medical Gas Research* 1:1-6, 2011.
6. Sciorsci RL, Lillo E, Occhiogrosso L, *et al.* Ozone therapy in veterinary medicine: A review. *Research Veterinary Science*, 130: 240-246, 2020.
7. Orlandin JR, Machado LC, Ambrosio CE, *et al.* Ozone and its derivatives in veterinary medicine: a careful appraisal. *Veterinary and Animal Science*, 13, 100191, 2021.
8. Lisciandro GR Editor, Point-of-care Ultrasound Techniques for the Small Animal Practitioner, 2nd Edition, Wiley-Blackwell, St. Louis, MO, USA 2021.
9. Lucidi CA. Ch. 38 – Precursor-Targeted Immune-Mediated Anemia and Pure Red Cell Aplasia in dogs and Cats. In: Schalm's Veterinary Hematology, Brooks M.B., Harr K.E., Seeling D.M., Wardrop K.J., Weiss D.J., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2022, 307-312.
10. Mehraban F, Seyedarabi A, Seraj Z, *et al.* Molecular insight into the effect of ozone on human hemoglobin in autohemotherapy: Highlighting the importance of the presence of blood antioxidants during ozonation. *International Journal of Biological Macromolecule*, 119:1276-1285, 2018.
11. Ben RN, Pirkouki ZH-N, Meraban F, *et al.* A novel molecular approach for enhancing the safety of ozone in autohemotherapy and insights into heme pocket autooxidation of hemoglobin. *ACS Omega*, 8, 20714-20759, 2023.