

CORNER DIAGNOSTICO

Citologia



PRESENTAZIONE CLINICA

Un cane femmina, Volpino di Pomerania di 6 anni, si presentava alla visita clinica per letargia, inappetenza e perdita di peso. In anamnesi si riportava la rimozione di una zecca in Brasile due mesi prima, una profilassi per ectoparassiti discontinua e un lieve sovradosaggio di clonazepam, somministrato una settimana prima durante il viaggio di ritorno in Italia. Alla visita la paziente si presentava abbattuta, con opacamento corneale bilaterale

Pierpaolo Romanelli, Med Vet
Mouse and Animal Pathology Laboratory (MAPLab),
Fondazione Unimi, Università degli Studi di Milano,
Milano, Italy.
Clinica veterinaria Tibaldi, Milano.

Michele Marino, PhD, MYLAV Laboratory

Camilla Raiteri, Med Vet, Internal Medicine Master's degree,
Clinica veterinaria Gammavet, Seregno (MB).

Walter Bertazzolo, Med Vet, EBVS®
European Specialist in Veterinary Clinical Pathology.
Scientific Director, MYLAV Laboratory.

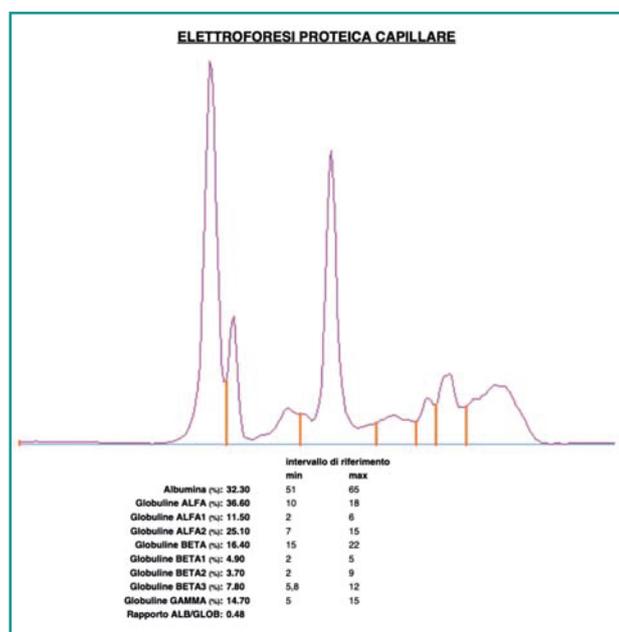


Figura 1 - Elettroforesi proteica capillare.

della regione equatoriale ed era percepibile un soffio cardiaco (2/6). In ecografia si riscontrava un lieve versamento tricavitario non campionabile. Venivano eseguiti esami ematochimici completi con elettroforesi sieroproteica (figura 1). Gli esami emocromocitometrico e biochimico sono riportati rispettivamente in tabella 1 e 2. Le figure 2, 3 e 4 si riferiscono allo striscio di sangue periferico (May Grunwald Giemsa quick stain).

DOMANDE PER IL LETTORE

- 1) Quali alterazioni ematologiche sono presenti?
- 2) Cosa osservi nello striscio di sangue periferico in figura 2, 3 e 4?
- 3) Dato il quadro clinico ed ematochimico, quale ipotesi eziopatogenetiche sospetteresti?
- 4) Come confermeresti la tua diagnosi presuntiva?

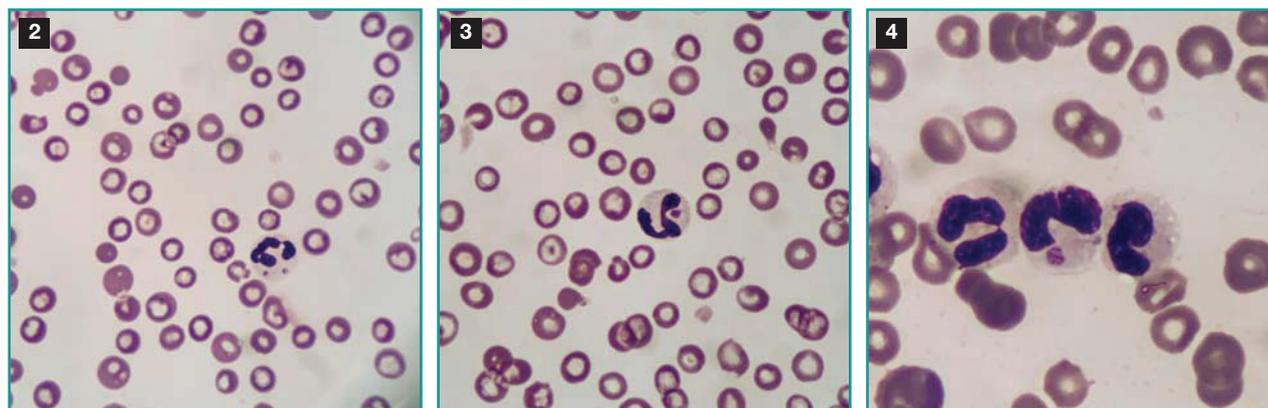


Figura 2, 3, 4 - Striscio ematico di cane, May Grunwald Giemsa quick stain, 100x.

Risposte alle pagine successive

Tabella 1 - Esame emocromocitometrico

	Valore paziente	Intervallo di riferimento
RBC 10 ⁶ /uL	1,82	5,65 - 8,87
Hgb g/dL	4	13,1 - 20,5
HCT %	12,6	37,3 - 61,7
MCV fL	69,2	61,6 - 73,5
MCH pg	22	21,2 - 25,9
MHCH g/dL	31,7	32 - 38
RDW %	25,5	13,6 - 21,7
Reticolociti %	5	<1%
Reticolociti/uL	91400	<60000
Hgb reticulociti pg	26,2	22,3 - 29,6
WBC	15905	5300 - 16500
Neutrofili banda/uL	636	0 - 300
Neutrofili segmentati/uL	14155	2900 - 13600
Linfociti/uL	477	800 - 4200
Monociti/uL	636	0 - 1000
Eosinofili/uL	0	0 - 1200
Basofili/uL	0	rari
PLT 10 ³ /uL	77	148 - 484
PCT %	0,14	0,14 - 0,46
Aggregati piastrinici	assenti	
Macropiastrine	+	
Stima piastrinica	non adeguata	
Anisocitosi	+	
Policromasia	+	
Sferociti	+	

Tabella 2 - Esame biochimico

	Valore paziente	Intervallo di riferimento
CPK (IU/L)	430	20 - 150
LDH (IU/L)	1021	45 - 233
GOT (IU/L)	80	12 - 54
GPT (IU/L)	205	15 - 64
ALP (IU/L)	1261	20 - 120
GGT (IU/L)	53	2 - 8
Bilirubina totale (mg/dL)	0,26	0,08 - 0,3
Glucosio (mg/dL)	117	75 - 115
Colesterolo (mg/dL)	240	110 - 330
Trigliceridi (mg/dL)	98	23 - 110
Urea (mg/dL)	21	11 - 43
Creatinina (mg/dL)	0,53	0,7 - 1,3
Proteine totali (g/dL)	5,44	5,5 - 7,6
Albumine (g/dL)	2,15	2,4 - 3,8
Globuline	3,29	2,5 - 4,3
Rapporto A/G	0,65	0,6 - 1,3
Calcio (mg/dL)	7,4	8 - 11,6
Fosforo (mg/dL)	3,1	2,5 - 5,5
Sodio (mEq/L)	126	140 - 152
Potassio (mEq/L)	3,3	3,5 - 5,5
Cloro (mEq/L)	91	108 - 120
Ferro totale (ug/dL)	396	76 - 173
Proteina C Reattiva (mg/dL)	26,6	0 - 1,5
Aptoglobina (HPT) (mg/dL)	266,9	18 - 117

RISPOSTE E RISULTATI

1) Grave anemia emolitica normocitica normocromica moderatamente rigenerativa, con modesta neutrofilia, left-shift, linfopenia e piastrinopenia.

L'esame biochimico rivela un aumento di GOT, CPK, LDH, GPT, GGT, ALP e ferro totale ed una ipoproteidemia con ipoalbuminemia, ipocalcemia, iponatriemia, ipopotassiemia ed ipocloremia. L'elettroforesi sieroproteica riflette un quadro infiammatorio acuto (figura 1) confermato da Proteina C reattiva e aptoglobina.

2) L'osservazione dello striscio di sangue periferico permette di evidenziare corpi inclusi intracitoplasmatici all'interno dei granulociti neutrofili; tali formazioni si presentano di forma irregolare, di colore viola, con dimensioni di circa 1-3 µm.

Si osserva inoltre la presenza di rari sferociti (Figura 2).

3) Tali corpi inclusi possono essere riferibili ad un'infezione da *Anaplasma spp.* Tuttavia, considerata l'anamnesi, è necessario includere nell'elenco delle diagnosi differenziali anche *Ehrlichia spp.*

4) Può essere utile eseguire una diagnostica sierologica con test rapidi o con immunofluorescenza indiretta (IFI)

per *Anaplasma spp.* ed *Ehrlichia spp.* Tuttavia, la conferma diagnostica si ottiene con tecniche molecolari (es. PCR) eseguite su sangue. Infatti, la sierologia ha maggiore utilità nelle fasi subcliniche/croniche di queste infezioni perché riflette la risposta anticorpale del paziente e non la presenza di malattia/infezione. Non a caso, nelle fasi acute è possibile ottenere risultati falsamente negativi.

Allo striscio si evidenziava anche anisocitosi e policromasia; il test dell'agglutinazione con soluzione salina (sodio cloruro 0,9%) era risultato negativo.

Per quanto riguarda le piastrine, il paziente aveva una stima inadeguata ma un piastrinocrito normale dovuto alla presenza di macropiastrine.

Lo Snap Test Idexx4Dx e l'IFI hanno evidenziato una debole positività (1:80 positivo) solo ad *E. canis*. Le IFI per *Anaplasma spp.*, *Rickettsia conorii* e *Babesia canis* sono risultate negative. Allo stesso modo, anche la PCR per *Anaplasma spp.*, con amplificazione del gene msp4, è risultata negativa. La Real Time - PCR specie-specifica per *E. canis* invece è risultata positiva, con amplificazione gene p30-10. Entrambe le Real Time - PCR sono state ef-

fettuate mediante l'utilizzo dei kit commerciali YouSeq (YouSeq Ltd., Winchester, UK).

DISCUSSIONE

Ehrlichia canis è un patogeno intracellulare appartenente alla famiglia delle *Rickettsiales*, responsabile dell'ehrlichiosi monocitica canina.¹ L'infezione è ubiquitaria ed è presente in Italia con casi autoctoni, soprattutto nelle regioni del Centro-Sud e sulle isole, ed è endemica in Brasile.^{2,3} Generalmente le morule di *Ehrlichia canis* sono presenti nei monociti e nei macrofagi sotto forma di "microcolonie" di batteri contenute all'interno di vacuoli avvolti da membrana. Tuttavia, studi recenti suggeriscono che, in alcune aree endemiche, la presenza di morule nei neutrofili può essere anch'essa indicativa di un'infezione da *Ehrlichia canis*.² Nel nostro paese queste morule sono invece associate ad infezione da *Anaplasma phagocytophilum*. *Ehrlichia canis* viene trasmesso dalla zecca *Rhipicephalus sanguineus*.⁵ La patogenesi comporta un periodo di incubazione di circa 8-20 giorni, seguito da tre fasi in successione: una fase acuta della durata di 1-4 settimane, una fase subclinica che può durare da mesi ad anni e una fase cronica. Non sempre la malattia progredisce seguendo le fasi; alcuni animali contraggono la malattia acuta in forma inapparente e in seguito possono diventare portatori subclinici dell'infezione per lunghi periodi di tempo. L'infezione da *Ehrlichia canis* non è considerata una zoonosi, ad eccezione della malattia sostenuta da un ceppo descritto solo in Venezuela.³

Le manifestazioni cliniche di frequente riscontro comprendono letargia, anoressia, febbre, linfadenomegalia, splenomegalia e tendenza alle emorragie (petecchie cutanee, ecchimosi ed epistassi). È possibile riscontrare anche segni oculari (es. emorragie, uveite, cherato-congiuntivite ecc.), poliartrite, polimiosite ed alterazioni di natura neurologica.^{1,3} Tipici riscontri di laboratorio sono trombocitopenia e anemia; meno frequente, è la pancitopenia dovuta alla deplezione delle cellule del midollo osseo nella fase cronica.^{3,4} La trombocitopenia si osserva in oltre il 90% dei casi di ehrlichiosi monocitica canina;³ l'anemia di solito si caratterizza come non rigenerativa normocitica normocromica, in particolare nelle forme croniche.⁵ Altri reperti frequentemente riportati sono la presenza di iperglobulinemia e ipoalbuminemia e un lieve aumento dei livelli di fosfatasi alcalina (ALP) e di alanina aminotransferasi (GPT).³ Sebbene non sia stata stabilita una relazione causa-effetto, è riportata la correlazione tra epatite e infezioni acute da *Ehrlichia canis*, anche come manifestazione clinica predominante.⁶

La risposta immunomediata svolge un ruolo importante nell'infezione da *Ehrlichia canis* ed è stato possibile dimostrare la presenza di anticorpi anti-piastrine meno di una settimana dopo l'infezione sperimentale del cane.³ La riduzione del numero di piastrine è causata da diversi

meccanismi, tra cui aumentato consumo, sequestro splenico, trombofagocitosi, riduzione dell'emivita o disfunzioni piastriniche (trombocitopatie). La presenza di morule nei preparati citologici ha una bassa sensibilità perché raramente evidenti (4% dei casi clinici); pertanto, tale reperto non può essere utilizzato quale principale criterio diagnostico.³

Nel caso descritto, la paziente può aver contratto l'infezione durante il suo soggiorno in Brasile ed aver manifestato una sintomatologia acuta in Italia. L'anemia poteva dipendere dallo stato infiammatorio. Tuttavia, non è possibile escludere completamente una componente immunomediata emolitica secondaria, visti gli aumenti di LDH, CPK, suggestivi di emolisi, e in particolare la presenza degli sferociti nello striscio ematico, potenzialmente suggestivi di un processo immunomediato. Va sottolineato che la risoluzione del quadro ematologico è avvenuta dopo un mese circa ed è stata conseguente al solo trattamento antibiotico con doxiciclina (Ronaxan 20 mg compresse-Merial, 10 mg/kg/24 h/os/4 settimane). Anche il quadro elettroforetico si è normalizzato dopo un mese circa, confermando che le alterazioni erano secondarie alla condizione infettiva.

Anche GPT, ALP e GGT si sono normalizzate dopo due mesi. L'aumento della GGT potrebbe essere riconducibile ad un sovradosaggio del clonazepam che ha una metabolizzazione epatica. Purtroppo, a riguardo, nel cane non sono disponibili evidenze scientifiche. Nell'uomo, però, studi recenti dimostrano le disfunzioni epatiche indotte da clonazepam.⁷

L'alterazione degli elettroliti è giustificata dalla presenza di un versamento tricavitario (pleurico, pericardico e addominale) e il calcio totale basso da ipoalbuminemia.

BIBLIOGRAFIA

- Harrus S, Waner T. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): An overview. *The veterinary journal* 2011;187:292-296, 1997.
- Aguiar DM, Rodrigues FP, Ribeiro MG, et al. Uncommon Ehrlichia canis infection associated with morulae in neutrophils from naturally infected dogs in Brazil. *Transboundary and emerging diseases*. 2020;67:135-141, 2019.
- Solano-Gallego L, Baneth G. Diagnosi delle malattie protozoarie e delle malattie trasmesse da artropodi. In: Villiers E, Ristic J, Paltrinieri S, Giordano A, Dondi F. *Gli Esami Di Laboratorio: Indicazioni, Esecuzione, Interpretazione*. 3.th ed. Milano: Edra; 2017, pp 617-636.
- European Scientific Counsel Companion Animal Parasites (ESC-CAP), *Controllo delle malattie trasmesse da vettori nel cane e nel gatto*, Linee guida 5 - terza edizione, aprile 2016, pp 36-38.
- Harrus S, Waner T, Neer TM. Ehrlichia canis infection. In: Greene, C.E. 2012, *Infectious diseases of the dog and cat*, 4.th edn, Elsevier Saunders, St. Louis, pp 227-238.
- Mylonakis ME, Kritsepi-Konstantinou M, et al. Severe Hepatitis Associated with Acute Ehrlichia canis Infection in a Dog. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 24:633-638, 2010.
- Kishimoto M, Adachi M, Takahashi K, et al. Clonazepam-induced liver dysfunction, severe hyperlipidaemia, and hyperglycaemic crisis: A case report. *SAGE open medical case reports*. 7:2050313X1984297, 2019.